

ANNE KAROLINE GROTH

**DIANEXINA NA LESÃO DE ISQUEMIA REPERFUSÃO NA
MUSCULATURA ESTRIADA DE RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Clínica Cirúrgica.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos L. Campos

CURITIBA

2011

Groth, Anne Karoline

Dianexina na lesão de Isquemia Reperusão na musculatura
estriada de ratos / Anne Karoline Groth. - Curitiba, 2011.
80f.:il. (algumas color); 29cm.

Orientador: Antonio Carlos Ligoeki Campos

Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) – Setor de Ciências de
Saúde, Universidade Federal do Paraná

1. Retalhos Cirúrgicos. 2. Modelos Animais. 3.Ratos. 4. Sobre-
vivência de tecidos. 5. Traumatismo por Reperusão. 6. Isquemia. I. Título



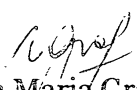
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
NÍVEIS - MESTRADO E DOUTORADO

Ata do julgamento da 140ª Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, referente a aluna **ANNE KAROLINE GROTH** sob o **Título** INFLUÊNCIA DA DIANEXINA NA ISQUEMIA REPERFUSÃO DA MUSCULATURA ESTRIADA DE RATOS na **Área de Concentração:** Nutrição e Cicatrização, tendo como orientador Prof. Dr. Antonio Carlos L. Campos

Às sete horas e trinta minutos do dia vinte de abril de dois mil e onze, no Auditório da CAD 7º andar do prédio central do Hospital de Clínicas, reuniu-se, em sessão pública, a Banca Examinadora de Avaliação composta pelos Professores Doutores Lydia Masako Ferreira, Nicolau Gregori Czezko, Ruth Maria Graf, Alfredo Benjamin Duarte da Silva e Renato da Silva Freitas sendo este último Presidente da Banca. Aberta a sessão, foi apresentada pelo Prof. Dr. Antonio Carlos L. Campos, Coordenador do Programa, a documentação probatória do cumprimento pela candidata das exigências legais que lhe facultam submeter-se à avaliação da tese, como última etapa à sua titulação no Programa. A seguir o Presidente da Banca Examinadora convidou a candidata a apresentar oralmente resumo de sua tese no prazo máximo de trinta minutos para demonstração de sua capacidade didática e para melhor conhecimento do tema por parte da audiência composta de professores, médicos, alunos, familiares e demais interessados. Seguiu-se a arguição e imediata resposta pela candidata, sucessivamente pelos componentes da Banca Examinadora. Obedecido o tempo máximo de vinte minutos para a arguição e igual tempo para cada resposta. Terminada a etapa de arguição, reuniu-se a Banca Examinadora em sala reservada para atribuição das notas, dos conceitos e lavratura do Parecer Conjunto. A candidata foi **APROVADA** considerando-se os parâmetros vigentes estabelecidos pelo programa e regidos pela legislação pertinente da instituição. Voltando à sala de sessão, o Senhor Presidente da Banca Examinadora leu os conceitos do Parecer Conjunto e deu por encerrada a sessão. E para que tudo conste, foi lavrada a presente Ata, que será assinada pelos seguintes componentes da Banca Examinadora.


Lydia Masako Ferreira


Nicolau Gregori Czezko


Ruth Maria Graf


Alfredo Benjamin Duarte da Silva


Renato da Silva Freitas

Aos meu pais

AGRADECIMENTOS

A elaboração deste trabalho só se tornou possível devido à colaboração de inúmeras pessoas e instituições. Nomear a todos seria impossível, no entanto, gostaria de registrar aquelas pessoas e/ou instituições que estiveram mais diretamente vinculadas à realização desta dissertação, aos quais agradeço:

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos L. Campos, Professor Titular do Departamento de Cirurgia, orientador desta dissertação, pela fundamental participação e dedicação; o que tornou possível a realização do trabalho e pela importante contribuição na minha formação profissional e acadêmica.

À Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, OH, EUA, pela oportunidade de realizar esta pesquisa e pelo alto nível do laboratório de Microcirurgia.

À Professora e Doutora Maria Siemionow, Professora Titular de Cirurgia; Diretora do Programa de Pesquisa em Cirurgia Plástica; Chefe do laboratório de Microcirurgia da Cleveland Clinic, OH, EUA, pela oportunidade de trabalhar em seu conceituado laboratório, pela constante orientação técnica durante todo o estudo e pelo exemplo de dedicação à pesquisa.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”.

(Albert Einstein)

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	ESTRUTURA DA MICROCIRCULAÇÃO.....	17
FIGURA 2	DISSECÇÃO DO MÚSCULO CREMASTER	23
FIGURA 3	ESQUEMA DOS VASOS NA DISSECÇÃO DO MÚSCULO CREMASTER.....	24
FIGURA 4	MÚSCULO CREMASTER EM ILHA.....	25
FIGURA 5	ESQUEMA DE COLOCAÇÃO DE CLAMPES.....	26
FIGURA 6	ACESSO VASCULAR.....	27
FIGURA 7	FLUXOGRAMA DA DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS.....	29
FIGURA 8	FOTOGRAFIA QUE DEMONSTRA O SISTEMA PARA AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA.....	30
FIGURA 9	ESQUEMA DEMONSTRANDO OS VASOS ANALISADOS NO ESTUDO.....	31
FIGURA 10	FOTOMICROGRAFIA DURANTE OBTENÇÃO DA VELOCIDADE DE O FLUXO DAS HEMÁCIAS PELO DOPPLER VELOCÍMETRO SOBRE A ARTERÍOLA DE 2 ^a ORDEM.....	32
FIGURA 11	FOTOMICROGRAFIA DA VÊNULA PÓS CAPILAR OBTIDA SOB MAGNIFICAÇÃO DE 40X.....	33
FIGURA 12	FOTOGRAFIA DO RETALHO POSICIONADO NA CÂMARA DE PLEXIGASS.....	34
FIGURA 13	IMAGEM DO SOFTWARE IMAGE PROPLUS OBTIDA COM A CÂMERA AXIOCAM MRm DIGITAL (Carl Zeiss, Alemanha) DA VÊNULA PÓS-CAPILAR APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE FITC-ALBUMINA.....	35
FIGURA 14	FOTOMICROGRAFIA OBTIDA COM A AXIOCAM MRm (Carl Zeiss, Alemanha) PARA A OBTENÇÃO DAS MEDIDAS DE DENSIDADE ÓTICA.....	36

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	DIÂMETRO DA VÊNULA PRINCIPAL (V1) EM CADA GRUPO, EM TODO O PERÍODO DE OBSERVAÇÃO.....	38
GRÁFICO 2	DIÂMETRO DA ARTERÍOLA PRINCIPAL (A1) EM CADA GRUPO, EM TODO O PERÍODO DE OBSERVAÇÃO.....	39
GRÁFICO 3	DIÂMETRO DA ARTERÍOLA DE 1ª ORDEM (A2-1) EM CADA GRUPO, EM TODO O PERÍODO DE OBSERVAÇÃO.....	40
GRÁFICO 4	DIÂMETRO DA ARTERÍOLA DE 2ª ORDEM (A2-2) EM CADA GRUPO, EM TODO O PERÍODO DE OBSERVAÇÃO.....	41
GRÁFICO 5	ÍNDICE DE EDEMA – RAZÃO ENTRE A DIFERENÇA DA MEDIDA DO DIÂMETRO EXTERNO DA VÊNULA PÓS-CAPILAR E O DIÂMETRO INTERNO (DE-DI)/DE . VALORES OBTIDOS DA MÉDIA DOS VALORES PROXIMAL, MÉDIO E DISTAL DO RETALHO.....	42
GRÁFICO 6	VELOCIDADE DO FLUXO SANGUÍNEO (mm/s) DA ARTERÍOLA DE 1ª ORDEM (A2-1)	43
GRÁFICO 7	LEUCÓCITOS EM ROLAMENTO (RELATIVO). MÉDIA DAS TRÊS ÁREAS DO RETALHO (PROXIMAL, MÉDIA E DISTAL).....	44
GRÁFICO 8	LEUCÓCITOS ADERIDOS (RELATIVO). MÉDIA DAS TRÊS ÁREAS DO RETALHO (PROXIMAL, MÉDIA E DISTAL).....	45
GRÁFICO 9	LEUCÓCITOS TRANSMIGRADOS (RELATIVO). MÉDIA DAS TRÊS ÁREAS DO RETALHO (PROXIMAL, MÉDIA E DISTAL).....	46
GRÁFICO 10	DENSIDADE CAPILAR EM CADA GRUPO, EM TODO O PERÍODO DE OBSERVAÇÃO.....	47
GRÁFICO 11	ÍNDICE DE PERMEABILIDADE EM CADA GRUPO, EM TODO O PERÍODO DE OBSERVAÇÃO.....	48

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	QUADRO 1 – RESUMO DOS RESULTADOS APRESENTADOS. COMPARAÇÕES DOS RESULTADOS OBTIDOS ENTRE OS GRUPOS ÚLTIMO MOMENTO DE AVALIAÇÃO. (↑ VALOR ESTATISTICAMENTE MAIOR ; ↓ VALOR ESTATISTICAMENTE MENOR; = VALOR ESTATISTICAMENTE IGUAL)
----------	--

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

IR	- isquemia reperfusão
FS	- fosfatidilserina
ATP	- trifosfato de adenosina
ICAM-1	- molécula intercelular de adesão 1
PMN	- leucócitos polimorfonucleares
RLO	- radicais livres de oxigênio
-OH	- radical hidroxila
H ₂ O ₂	- peróxido de hidrogênio
O ₂ ⁻	- anion superóxido
O ₂	- oxigênio
SOD	- superóxido dismutase
NF-κB	- fator nuclear kappa B
TNF-α	- fator de necrose tumoral alfa
IL-1	- interleucina-1
VCAM-1	- molécula de adesão da célula vascular
IL-6	- interleucina-6
IL-8	- interleucina-8
ADP	- adenosina difosfato
<i>MPTP</i>	- <i>mitochondrial permeability transition pore</i>
NOS	- óxido nítrico sintetase
ON	- óxido nítrico
CAM	- moléculas de adesão celular

ICAMs	- moléculas de adesão celular intercelulares
CPK	- proteína quinase C
CO ₂	- dióxido de carbono
FITC-a	- fluorosceína isotiocianato-albumina
SSI	- solução salina isotônica
V1	- vênula principal
A1	- arteríola principal
A2-1	- arteríola de 1 ^a ordem
A2-2	- arteríola de 2 ^a ordem
A3-1	- ramo da arteríola de 1 ^a ordem
A3-2	- ramo da arteríola de 2 ^a ordem
DE	- diâmetro externo
DI	- diâmetro interno
A1	- arteríola principal
ILE	- interação leucócito endotelial
IP	- índice de permeabilidade
M	- média
EP	- erro padrão
PRÉ	- Grupo submetido a administração de dianexina antes do período de isquemia
PÓS	- Grupo submetido a administração de dianexina após o período de isquemia
EUA	- Estados Unidos da América

LISTA DE SÍMBOLOS

g	- Grama
M	- Média
min	- minuto
h	- hora
ml	- Mililitro
μm	- Micrômetro
n	- Tamanho da amostra
nº	- Número
p	- Nível de significância estatística
PO	- Pós-operatório
vs.	- versus
%	- Porcentagem
Fr	- Escala French

RESUMO

Introdução: Lesão de isquemia reperfusão é uma sequela comum e devastadora do retorno do fluxo sanguíneo a um tecido submetido a isquemia. Fosfatidilserina é um fosfolípide que compõe a membrana celular, e que sob condições normais, encontra-se apenas na face citoplasmática da membrana celular. Entretanto, durante a isquemia, a fosfatidilserina é translocada para a face externa da membrana celular, e, no caso das células endoteliais, para o interior da microcirculação. A externalização da fosfatidilserina promove a ativação dos leucócitos e plaquetas, com consequente piora da lesão de isquemia reperfusão. Dianexina é um dímero sintético da anexina A5 humana, e é um potente bloqueador da fosfatidilserina, com maior meia vida e afinidade pela fosfatidilserina do que a anexina a5. Esta capacidade de bloqueio da fosfatidilserina pela dianexina inibe a ligação de leucócitos ao endotélio, com possíveis aplicações no tratamento/prevenção da lesão de isquemia reperfusão. O objetivo do presente estudo é determinar se a dianexina tem efeitos protetores na microcirculação no retalho de músculo cremaster de ratos submetido a 2 horas de isquemia. **Material e Método:** 53 ratos Lewis foram submetidos a dissecação do retalho cremaster e distribuídos aleatoriamente em 4 grupos: 1)CONTROLE sem isquemia; 2)PLACEBO e 2h de isquemia; 3)PRÉ – administração de 100µg/kg de dianexina antes do período de 2 h de isquemia; e 4)PÓS - administração de 100µg/kg de dianexina imediatamente após o período 2 h de isquemia. Foram realizadas observações sequenciais de parâmetros hemodinâmicos e de permeabilidade: diâmetro dos vasos; velocidade de fluxo sanguíneo; índice de edema; densidade capilar; interações leucócitos endoteliais e índice de permeabilidade. A média de cada parâmetro a cada momento de avaliação foi comparada entre os grupos utilizando análise de variância (ANOVA) e teste t foi utilizado para comparações entre pares de grupos. Os dados são expressos como média \pm erro padrão ($p \leq 0,05$). **Resultados:** O grupo PÓS obteve o menor índice de permeabilidade comparado ao grupo PLACEBO ($0,45 \pm 0,035$ vs $0,54 \pm 0,046$) ($p=0,043$). O grupo PÓS demonstrou aumento no diâmetro da arteríola de 1ª ordem em comparação ao grupo CONTROLE ($91,71 \pm 3,36$ vs $69,61 \pm 7,81$) ($p=0,011$) e ao grupo PRÉ ($91,71 \pm 3,36$ vs $73,22 \pm 4,03$) ($p=0,015$). A dianexina inibiu a transmigração de leucócitos no grupo PÓS, a adesão de leucócitos ao endotélio no grupo PRÉ e o rolamento de leucócitos nos grupos PRÉ e PÓS. **Conclusão:** A administração de dianexina, especialmente quando administrada após a isquemia (grupo PÓS) promove redução da ativação dos leucócitos e protege o músculo da lesão de isquemia reperfusão em um modelo de 2h de isquemia em músculo cremaster de ratos

DESCRITORES: Retalhos cirúrgicos. Sobrevivência de Tecidos. Modelos Animais. Traumatismo por Reperfusão. Isquemia.

ABSTRACT

Introduction: Ischemia reperfusion injury is a common and devastating sequel of blood flow restoration after ischemia. Phosphatidylserine is a phospholipid restricted to the inner side of the cell membrane, however, during ischemia, PS is externalized to the microcirculation lumen, thereby activating leukocytes and platelets, and aggravating ischemia reperfusion injury. Diannexin is a syntetic drug, a recombinant homodimer of human annexin A5, and a potent blocker of phosphatidylserine, with higher affinity for phosphatidylserine and longer half life than the monomer. Such affinity for phosphatidylserine inhibits leucocyte attachment to endothelial cells with possible application in ischemia reperfusion injury treatment/prevention. The aim of the study to to determine if Diannexin has protective effects on the rat cremaster muscle flap microvascular network submitted to 2 hours of ischemia. **Material and Method:** Fifty three Lewis rats were randomly assigned into the following groups: 1)CONTROL without ischemia; 2)PLACEBO and 2h ischemia; 3)PRÉ -100µg/kg Diannexin before 2h ischemia; and 4)PÓS - 100µg/kg Diannexin after 2h ischemia. All animals were submitted to cremaster muscle flap dissection and intravital observations, for hemodynamics and permeability parameters. Vessels diameters, blood flow velocity, edema index, capillary density, leukocyte interactions and permeability index were obtained. The mean of all parameters at each time point were compared between groups using analysis of variance (ANOVA) models, and T tests were used for comparison between pair of groups. The data is expressed as mean \pm standard error. **Results:** PÓS group showed the lowest permeability index compared to PLACEBO ($0,45 \pm 0,035$ vs $054 \pm 0,046$)($p=0,043$). Also, first-order arterioles had diameter increase in the PÓS group vs CONTROLE ($91,71 \pm 3,36$ vs $69,61 \pm 7,81$)($p=0,011$) and vs PRÉ ($91,71 \pm 3,36$ vs $73,22 \pm 4,03$)($p=0,015$). Diannexin inhibited transmigration of leukocytes in PÓS group, leukocyte adhesion in PRÉ group and leukocyte rolling in PÓS and PRÉ groups. **Conclusion:** Diannexin administration, particularly after the ischemic event (group PÓS) reduces leukocyte activation and protects muscle against IRI in a rat cremaster muscle flap submitted to 2 h ischemia.

KEY-WORDS: Surgical flaps. Tissue Survival. Animal Model. Reperfusion Injury. Ischemia.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 OBJETIVO	2
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 ISQUEMIA REPERFUSÃO	3
2.1.1 Lesão de não reperfusão	4
2.1.2 Fisiopatologia da Isquemia Reperfusão	5
2.1.3 Radicais livres do Oxigênio	6
2.1.4 Citocinas	7
2.1.5 Lesão Mitocondrial	8
2.2 DISFUNÇÃO ENDOTELIAL	9
2.3 INTERAÇÃO LEUCÓCITO ENDOTELIAL (ILE)	10
2.4 FOSFATIDILSERINA	12
2.5 APOPTOSE	14
2.6 ANEXINAS	15
2.7 MICROCIRCULAÇÃO.....	16
2.7.1 Modelo experimental do estudo da microcirculação	18
2.7.2 Microscopia Intravital	19
2.7.3 Avaliação hemodinâmica	20
2.7.4 Avaliação de permeabilidade	20
3. MATERIAL E MÉTODO	22
3.1 AMOSTRA	22
3.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	22
3.2.1 Anestesia	22
3.2.2 Preparo pré-operatório.....	23
3.2.3. Dissecção Cirúrgica do Músculo Cremaster	23
3.2.4. Dissecção da região cervical.....	26
3.2.5. Controle do meio externo	27
3.2.6. Eutanásia dos animais	28
3.3. DELINEAMENTO DOS GRUPOS	28
3.4. MEDIDAS DE AVALIAÇÃO.....	29
3.4.1. Microscopia intra-vital/ Avaliação hemodinâmica	29
3.4.2. Microscopia intravital/ Avaliação de permeabilidade	34
3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
4. RESULTADOS	38
4.1. AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA.....	38
4.1.1. Diâmetro dos vasos.....	38
4.1.2 Índice de Edema	41
4.1.3. Velocidade do Fluxo Sanguíneo	42
4.1.4 Interação leucócito endotelial.....	43
4.1.5. Densidade capilar.....	46
4.2. AVALIAÇÃO DE PERMEABILIDADE	47
5. DISCUSSÃO.....	50
5.1 MODELO EXPERIMENTAL	50
5.2 TEMPO DE ISQUEMIA	51

5.3 PARÂMETROS HEMODINÂMICOS	52
5.4 OUTRAS DROGAS.....	53
5.5 ESTUDOS COM DIANEXINA	54
5.6 PERSPECTIVAS	55
6. CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS.....	59
APÊNDICES	64
ANEXO.....	80

1. INTRODUÇÃO

Isquemia reperfusão (IR) é um processo inevitável e devastador que se segue ao retorno de fluxo sanguíneo após a sua interrupção de qualquer natureza. Esta situação é bastante comum em acidente vascular cerebral, infarto agudo do miocárdio, oclusão arterial aguda em membros e transplantes de órgãos.

Muitas vezes a lesão causada na reperfusão dos tecidos é pior do que aquela causada durante a isquemia. Na cirurgia plástica este fenômeno é particularmente importante em cirurgias em que é necessária a utilização de retalhos, principalmente, retalhos musculares microcirúrgicos.

A fosfatidilserina (FS) é um fosfolípide presente nas membranas celulares. Em condições normais a FS está restrita à superfície citoplasmática da membrana. Entretanto, durante a isquemia e a depleção de ATP (trifosfato de adenosina) ocorre externalização da FS no interior do lúmen da microcirculação.

A FS evertida promove a ativação dos leucócitos e plaquetas que chegam à microcirculação com a reperfusão após um período isquêmico. Estas células se aderem ao endotélio lesado e liberam substâncias oxidantes que pioram a lesão endotelial. A aderência de leucócitos e plaquetas ao endotélio diminui o lúmen dos vasos da microcirculação, com consequente diminuição do fluxo sanguíneo.

Neste círculo vicioso a reperfusão desencadeia a cascata inflamatória e de coagulação no interior do leito da microcirculação, promovendo piora na lesão isquêmica do órgão afetado após o restauro do fluxo sanguíneo.

Na busca pela inativação deste mecanismo deletério, a terapia de “não adesão” representa uma nova abordagem na terapia da lesão por IR (THIAGARAJAN; WINN; HARLAN, 1997). Baseado no princípio de “não adesão”, observou-se que a proteína anticoagulante natural humana, anexina A5, se liga à FS evertida e tem a potencial finalidade de prevenir o recrutamento de células inflamatórias e plaquetas durante a reperfusão.

Dianexina é o dímero sintético da anexina A5 e tem afinidade maior pela FS e maior tempo de meia vida do que a anexina A5, e parece ser uma potente opção terapêutica em situações em que a reperfusão causa lesão aos tecidos.

Estudos prévios mostram que a dianexina diminui a lesão de IR *in vitro* e *in vivo* em modelo de isquemia hepática e, também, em um modelo de isquemia de musculatura estriada de 5 horas (MOLSKI; GROTH; ALLISON; HENDRICKSON;

SIEMIONOW, 2009). Entretanto não está claro se há diminuição da lesão de IR com a administração de dianexina em modelo de isquemia mais curto em musculatura estriada.

1.1 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo é determinar se a dianexina afeta a lesão de isquemia reperfusão em modelo de IR de 2 horas na musculatura estriada de ratos mediante determinação de parâmetros hemodinâmicos e de interações leucócitos endoteliais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ISQUEMIA REPERFUSÃO

A lesão de isquemia reperfusão é definida o processo pelo qual o restabelecimento do fluxo sanguíneo a um órgão ou tecido após um período crítico de isquemia resulta em lesão de parênquima e disfunção do órgão ou tecido (TAPURIA; KUMAR; HABIB; ABU AMARA; SEIFALIAN; DAVIDSON, 2008).

Isquemia é caracterizada por interrupção do suprimento sanguíneo que pode levar a lesão tecidual. Surpreendentemente é o retorno do fluxo sanguíneo, o processo de reperfusão, que pode causar maiores danos (KHALIL; AZIZ; HALL, 2006). Inicialmente identificado na década de sessenta, também chamado de “choque do desclameamento”, a lesão de reperfusão foi descrita em 1975 (CERRA; LAJOS; MONTES; SIEGEL, 1975). Os autores observaram que o retorno do fluxo sanguíneo estava relacionado à necrose hemorrágica subendotelial.

A lesão celular resultante da isquemia depende do tecido, pois o músculo estriado pode permanecer até 120 minutos em isquemia, enquanto o intestino sofre lesão irreversível somente após 30 minutos de isquemia.

A lesão de reperfusão tem importância clínica, pois afeta pacientes de cirurgia cardíaca, transplantes, cirurgia de mão, cirurgia plástica e pacientes vítimas de acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio. A repercussão na função dos órgãos dependerá do grau e da duração da isquemia e também da sensibilidade própria de cada órgão (KHALIL; AZIZ; HALL, 2006).

No transplante pulmonar, a lesão de IR induzida no pulmão é caracterizada por dano alveolar não específico, edema pulmonar e hipoxemia. A forma mais grave pode levar a disfunção primária do enxerto e permanece como causa de morbidade e mortalidade significativas após transplante pulmonar (DE PERROT; LIU; WADDELL; KESHAVJEE, 2003). O aumento da permeabilidade microvascular nos pulmões parece obedecer padrão bimodal, com incidência máxima aos 30 minutos e após 4 horas de reperfusão (EPPINGER; DEEB; BOLLING; WARD, 1997).

Na cirurgia cardíaca e na isquemia miocárdica, a morte celular após IR tem várias características de apoptose e necrose. Durante a isquemia os cardiomiócitos

expressam ICAM-1. Leucócitos ligam-se a estes receptores e liberam o conteúdo de seus grânulos em contato direto com as células (DAVANI; DORSCHIED; LEE; VAN BREEMEN; WALLEY, 2004); (NIESSEN; LAGRAN; VISSER; MEIJER; HACK, 1999). Leucócitos entram no miocárdio durante a cirurgia de revascularização das coronárias e se degranulam durante a reperfusão (FABIANI; FARAH; VUILLEMINOT; LECOMPTE; EMERIT; CHARDIGNY; CARPENTIER, 1993).

A lesão de IR é a causa primária da insuficiência hepática após choque hemorrágico, clampeamento temporário do ligamento hepatoduodenal e transplante hepático. A patogênese da IR hepática é complexa e vários fatores contribuem para o dano tecidual (SERRACINO-INGLOTT; HABIB; MATHIE, 2001). A falta de oxigênio leva à depleção de ATP mitocondrial, alterando a homeostasia iônica, o que leva à ativação de enzimas hidrolíticas e a alteração da regulação do volume celular. Após a reoxigenação, a formação de espécies reativas de oxigênio promove estresse oxidativo. A combinação destes eventos é responsável pela morte celular por necrose ou apoptose (JAESCHKE; LEMASTERS, 2003). Por outro lado a liberação de mediadores inflamatórios pelas células de Kupffer, associada à expressão aumentada de moléculas de adesão (ICAM-1 e VACM-1 - Molécula de adesão vascular celular 1) pelas células sinusoidais, promovem a infiltração de granulócitos e monócitos no fígado, que contribui ainda mais para a progressão da lesão tecidual (ALBANO, 2007); (JAESCHKE; LEMASTERS, 2003).

As transferências de retalhos microcirúrgicos são procedimentos comuns em cirurgia plástica. Estas transferências cursam com período obrigatório de isquemia no músculo exposto. O mecanismo de IR nos retalhos livres também é multifatorial, e os leucócitos têm sido implicados como fonte de radicais livres de oxigênio, e causam a lesão de IR não só nos músculos mas também em vários órgãos isquêmicos (TUREGUN; GUDEMEZ; NEWMAN; ZINS; SIEMIONOW, 1999).

2.1.1 Lesão de não reperfusão

O termo “no-reflow” ou não reperfusão foi criado em 1968 para descrever a oclusão total do sistema capilar isquêmico no cérebro (AMES; WRIGHT; KOWADA; THURSTON; MAJNO, 1968). Consiste na redução secundária do fluxo sanguíneo e

extensão subsequente da lesão celular na lesão de reperfusão. Mediadores inflamatórios e moléculas celulares de adesão iniciam as sequências inflamatórias e de coagulação, causando a oclusão de capilares. Apesar de ter sido inicialmente descrito após isquemia cerebral prolongada, este fenômeno foi observado em outros tecidos, tais como rins, fígado, músculo esquelético e miocárdio. Manifesta-se clinicamente como a disfunção continuada do órgão após a reperfusão, como, por exemplo, a falha de um órgão transplantado ou isquemia persistente em membros e síndrome compartimental em isquemias periféricas. Nenhum mecanismo singular é responsável por este fenômeno, uma vez que este ocorre por combinação de vários distúrbios mecânicos, bioquímicos e celulares desencadeados pelas células endoteliais no processo de reperfusão. A gravidade da não-reperfusão depende da gravidade e da duração do processo de isquemia (GIRN; AHILATHIRUNAYAGAM; MAVOR; HOMER-VANNIASINKAM, 2007).

O fenômeno de não reperfusão é bastante conhecido na literatura de cirurgia plástica. Este fenômeno foi descrito em retalhos microcirúrgicos e atribuído a edema celular, agregação intravascular e extravasamento de líquido para o interstício (MAY; CHAIT; O'BRIEN; HURLEY, 1978). Processo inflamatório intenso nas vênulas pós-capilares como consequência do fenômeno de não-reperfusão foi evidenciado (SCOTT ISENBERG, 2003).

O fenômeno de não reperfusão inclui alterações na motricidade vascular, edema celular e intersticial, trombose vascular, infiltração leucocitária, produção de radicais livre do oxigênio, agregação plaquetária e alterações da atividade metabólica (CUNHA, 2007).

2.1.2 Fisiopatologia da isquemia reperfusão

Períodos prolongados de isquemia estimulam a glicólise, que propicia acúmulo de ácido láctico; que leva à diminuição do pH intracelular. Além disso, a redução do ATP causada pela isquemia tecidual inibe a ATPase Na^+/K^+ , resultando em aumento do Na^+ e do Ca^{++} intracelulares. A depleção do ATP associada à elevação do Ca^+ pode levar ao declínio gradual da integridade celular, e se a

duração da isquemia se prolongar além do período de tolerância de cada tecido, ocorrerá a necrose (GRANGER, 1999).

A reperfusão é o tratamento para prevenir a necrose em tecidos isquêmicos. Entretanto, a reperfusão, paradoxalmente, leva a nova condição fisiopatológica chamada lesão de reperfusão. O restabelecimento do fluxo sanguíneo na área isquêmica restaura o metabolismo aeróbio e dá suporte para a recuperação tecidual, porém será acompanhado de lesões significativas. A vasomotricidade e a função endotelial são profundamente afetadas pela reperfusão. Além disso, esta será acompanhada por respostas inflamatórias importantes, caracterizadas pela ativação do complemento e de leucócitos polimorfonucleares (PMN) e pela maciça produção de radicais livres de oxigênio (RLO). O estado pró-inflamatório induzido pela reperfusão continua por vários dias. Além disso, o estresse oxidativo, a produção de citocinas e as lesões secundárias das mitocôndrias induzem à apoptose no parênquima e no leito vascular das estruturas (GOURDIN; BREE; DE KOCK, 2009).

O endotélio vascular representa um dos elementos mais importantes na cascata inflamatória, em virtude da sua habilidade de regular a adesão e subsequentemente a infiltração de leucócitos.

Os principais eventos da lesão de IR incluem: aumento da degeneração do ânion superóxido (MUNZEL; AFANAS'EV; KLESCHYOV; HARRISON, 2002), aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias no interstício e no leito vascular (FRANGOIANNIS; YOUKER; ROSSEN; GWECHENBERGER; LINDSEY; MENDOZA; MICHAEL; BALLANTYNE; SMITH; ENTMAN, 1998); (KORTHUIS; GRANGER; TOWNSLEY; TAYLOR, 1985), lesão mitocondrial (HALESTRAP, 2009), disfunção endotelial e diminuição da produção de óxido nítrico endógeno (DAVIES; HAGEN, 1993).

2.1.3 Radicais livres de Oxigênio

Radicalis livres de oxigênio, tais como o radical hidroxila (-OH), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), anion superóxido (O_2^-) e o oxigênio isolado (O_2) são de importância central na lesão de reperfusão. O peróxido de hidrogênio e o oxigênio isolado, por definição, não são radicais livres de oxigênio, embora apresentem

comportamentos semelhantes. Em condições fisiológicas normais, os efeitos danosos do superóxido são prevenidos pela superóxido dismutase (SOD), a qual converte o superóxido em peróxido de hidrogênio. Entretanto, durante a reperfusão de tecidos isquêmicos, estas defesas naturais estão prejudicadas, havendo desequilíbrio dos fatores oxidantes e antioxidantes, e o peróxido de hidrogênio é convertido no radical hidroxila. O radical hidroxila promove dano de grande variedade de moléculas, incluindo aminoácidos, proteínas transportadoras de membrana, enzimas do citocromo e ácidos nucleicos (HALLIWELL, 1992); (HALLIWELL; CLEMENT; LONG, 2000); (TYLER, 1975). A enzima xantina oxidase é a maior produtora de radicais superóxidos em tecidos após isquemia.

Radicais livres de oxigênio estão envolvidos em processos sinalizadores importantes em várias doenças cardiovasculares, incluindo a IR. A sinalização induzida por RLO é mediada pelo aumento da transcrição de proteínas reguladoras, tais como fator nuclear kappa B (NF- κ B) e fator induzível por hipóxia dentro do endotélio (LI; JACKSON, 2002). Isto leva ao aumento da transcrição de ICAM e fator de crescimento do endotélio vascular, resultando no aumento da adesão de leucócitos e plaquetas ao endotélio (KIETZMANN; GORLACH, 2005).

Agentes ou condições que inibem a produção de radicais livres de oxigênio têm sido estudados como terapêutica para a lesão de isquemia-reperfusão, tais como o alopurinol, que atua como inibidor da xantina oxidase (CUNHA; DA SILVA; NAKAMOTO; FERREIRA, 2005), a glutathione (KOPAL; DEVECI; OZTURK; SENGEZER, 2007) e o oxigênio hiperbárico (FRIEDMAN; FITZMAURICE; LEFAIVRE; VECCHIOLLA; CLARKE, 2006).

2.1.4 Citocinas

Apesar das citocinas estarem intimamente ligadas a processos inflamatórios, no processo de IR elas não estão ligadas especificamente à inflamação. A produção de citocinas após IR é transitória, com níveis basais baixos ou ausentes. TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) é uma citocina pró-inflamatória que apresenta inúmeras funções biológicas. Nas células endoteliais, TNF- α estimula a

reorganização dos filamentos de actina, promovendo dano celular e perda das junções (*tight junctions*) manifestados por extravasamento capilar (SATO; GOTO; HARANAKA; SATOMI; NARIUCHI; MANO-HIRANO; SAWASAKI, 1986).

Interleucina 1 (IL-1) é um potente agente quimiotático (POBER; LAPIERRE; STOLPEN; BROCK; SPRINGER; FIERS; BEVILACQUA; MENDRICK; GIMBRONE, 1987) e aumenta a expressão de ICAM-1 e de moléculas de adesão das células vasculares (VCAM-1) nas células endoteliais (ISODA; SHIIGAI; ISHIGAMI; MATSUKI; HORAI; NISHIKAWA; KUSUHARA; NISHIDA; IWAKURA; OHSUZU, 2003). Interleucina 6 (IL-6) além de induzir adesão celular, também aumenta a permeabilidade endotelial. Interleucina 8 (IL-8) é um agente quimiotático potente. Níveis elevados de IL-8 foram detectados após IR miocárdica, esquelética e renal (ALBADAWI; PATTON; BRATTON; PETERSON; WATKINS, 2007); (ARAKI; FAHMY; ZHOU; KUMON; KRISHNAMURTHI; GOLDFARB; MODLIN; FLECHNER; NOVICK; FAIRCHILD, 2006); (HUA; AL-BADAWI; ENTABI; STONER; DIAMOND; BONHEUR; HOUSER; WATKINS, 2005). Interleucina-8 também estimula a degranulação dos leucócitos e a liberação de enzimas proteolíticas, por este mecanismo, IL-8 foi sugerida como a ligação entre a adesão de leucócitos e o aumento da produção de radicais livres, particularmente nas vênulas pós-capilares (ENGLER; DAHLGREN; MORRIS; PETERSON; SCHMID-SCHONBEIN, 1986); (GIRN, *et al.*, 2007).

2.1.5 Lesão Mitochondrial

O período isquêmico leva à queda profunda da relação ATP/ADP (adenosina trifosfato/adenosina difosfato) e à produção de ácido láctico, com consequente queda do pH intracelular. Na tentativa de corrigir a queda do pH, a célula utiliza a proteína de transporte Na^+/H^+ . Entretanto, esta proteína de transporte carrega a célula com Na^+ , e como os níveis de ATP estão diminuídos, o Na^+ não pode ser bombeado para fora. Como resultado, a célula se sobrecarrega com Ca^{++} através da proteína de transporte $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$. No período de reperfusão este Ca^{++} entra na mitocôndria e ao mesmo tempo, o suprimento de oxigênio é restaurado, levando à

formação de RLO. À medida que o fluxo sanguíneo é restaurado, com a diminuição do ácido láctico e com a restauração das bombas reguladoras de pH, ocorre a abertura de poros de transição na membrana interna das mitocôndrias (*mitochondrial permeability transition pore – MPTP*). A abertura destes poros permite que a membrana interna mitocondrial torne-se permeável a qualquer molécula menor que 1,5 kDa, incluindo prótons. Portanto a mitocôndria torna-se não-acoplada (HALESTRAP; MCSTAY; CLARKE, 2002). Uma vez que a mitocôndria não é capaz de manter o gradiente de pH, torna-se incapaz de sintetizar ATP (HALESTRAP, 2006). A permanência prolongada da abertura deste poro (*MPTP*) resulta em edema da matriz, ruptura da membrana mitocondrial externa, liberação de moléculas pró-apoptóticas, tais como o citocromo C no citosol e, conseqüentemente, à apoptose celular por mecanismos dependentes ou independentes da caspase (KIM; HE; LEMASTERS, 2003).

2.2 DISFUNÇÃO ENDOTELIAL

O endotélio é uma camada fina confluyente de células achatadas que revestem a superfície íntima de todos os vasos sanguíneos. O endotélio exerce funções reguladoras importantes tais como regulação da hemodinâmica, remodelamento vascular, imunorregulação, além de contribuir para processos metabólicos, sintéticos e anti e pró-trombogênicos (DAVIES; HAGEN, 1993). As células endoteliais intactas secretam uma variedade de substâncias que alcançam a circulação ou se difundem para as células musculares lisas vasculares, contribuindo para a regulação do fluxo sanguíneo (GAVIN; HAUNSO, 1998). O desequilíbrio da homeostasia interna por uma série de estímulos (isquemia, reperfusão, lesão física local e inflamação) promove a ativação do endotélio. O sistema vascular e, principalmente, o endotélio são bastante sensíveis à lesão de isquemia-reperfusão.

Disfunção endotelial precoce ocorre principalmente nos vasos de pequeno calibre e inicia-se com a reperfusão, podendo persistir por 4 a 12 semanas (QUILLEN; SELLKE; BROOKS; HARRISON, 1990). A causa da disfunção endotelial tem várias hipóteses: a produção excessiva de RLO, deficit de dihidrobiopterina, cofator essencial para a óxido nítrico sintetase (NOS) e produção da fração C5b-9

do complemento (ELTZSCHIG; COLLARD, 2004); (LEFER; MA, 1993); (SALVEMINI; CUZZOCREA, 2002); (TIEFENBACHER; CHILIAN; MITCHELL; DEFILY, 1996); (WEYRICH; MA; LEFER, 1992).

Vários estudos demonstraram que a vasoconstrição e a vasodilatação independente do endotélio (após a hipóxia) estão pouco deterioradas na IR. Por outro lado, a vasodilatação dependente do endotélio é bastante afetada. Estes resultados demonstram que ocorre maior resistência à IR na musculatura lisa vascular do que no endotélio (BESSE; TANGUY; BOUCHER; BULTEAU; RIOU; DE LEIRIS; SWYNGHEDAUW, 2002); (QUILLEN, *et al.*, 1990).

O endotélio é a maior fonte da molécula de óxido nítrico (ON). Em condições normais a produção de ON promove vasodilatação, que tem efeitos protetores durante a IR por influenciar o consumo de oxigênio, a agregação plaquetária e a adesão de leucócitos. Paradoxalmente, em altas concentrações, o ON pode potencializar a toxicidade mediada por radicais livres de oxigênio por promover a formação de espécies altamente reativas tais como o peroxinitrito (BECKMAN; BECKMAN; CHEN; MARSHALL; FREEMAN, 1990); (WANG; ZWEIER, 1996).

Além do ON, existem outros mecanismos fisiopatológicos em que o endotélio está envolvido na isquemia-reperfusão. A lesão endotelial aumenta a permeabilidade vascular e o recrutamento de células inflamatórias. Moléculas de adesão celular expressas pelo endotélio danificado (ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina) promovem invasão do tecido por células inflamatórias. Estas células infiltrantes, incluindo em particular os leucócitos, são tóxicas para os tecidos pela secreção de proteases, por gerar RLO e por ocluir a microcirculação (TURER; HILL, 2010)

2.3 INTERAÇÃO LEUCÓCITO ENDOTELIAL (ILE)

Leucócitos normalmente atravessam a microcirculação impulsionados pelo fluxo sanguíneo. A aderência dos PMN ao endotélio sobrepuja a força de fluxo normal pela redução do fluxo inerente aos eventos isquêmicos, associada com a interação de receptores protéicos com ligantes apropriados, que são expressos na superfície tanto dos PMN como das células endoteliais.

A ativação do endotélio leva ao recrutamento de leucócitos mediante cascata de eventos que consistem de: rolamento leucocitário, adesão firme e migração transendotelial. A migração transendotelial ocorre tanto pelas rotas paracelular (nas junções endoteliais) como transcelulares (através das células endoteliais) (KVIETYS; SANDIG, 2001); (YANG; FROIO; SCIUTO; DVORAK; ALON; LUSCINSKAS, 2005). Estes passos são facilitados por aumento da permeabilidade do endotélio lesado, aumento da expressão ou alteração das moléculas de adesão e citocinas, e redução da disponibilidade de mediadores anti-inflamatórios, tais como o óxido nítrico.

A adesão leucócito endotelial é regulada por um mecanismo receptor-ligante. As moléculas de adesão dos leucócitos são chamadas integrinas, enquanto no endotélio as moléculas de adesão são chamadas de CAM, ou moléculas de adesão celular. A expressão das CAMs em resposta a estímulos inflamatórios é um processo coordenado por proteínas específicas dentro do endotélio e por células inflamatórias. O fator nuclear kappa B (NF- κ B) é uma proteína reguladora de genes (BAEUEERLE; HENKEL, 1994) presente no citoplasma na maioria das células na forma inativa. É um fator de transcrição envolvido no controle da expressão de diversos genes ligados à resposta inflamatória. Após ativada, esta proteína estimula a expressão gênica de CAMs além de vários outros mediadores pró-inflamatórios. CAMs intercelulares (ICAMs) são glicoproteínas expressas na superfície das células endoteliais (SPRINGER, 1994), que se ligam às integrinas expressas pelas células sanguíneas.

Selectinas também são um grupo de proteínas de ligação da superfície das células que facilitam a migração endotelial de leucócitos. Existem 3 membros na família das selectinas: L-selectina nos leucócitos, P-selectina nas plaquetas, e E-selectina nas células endoteliais (TEDDER; STEEBER; CHEN; ENGEL, 1995). As selectinas interagem com integrinas para acentuar as adesões endotélio-celulares.

O rolamento ocorre quando os leucócitos fazem contatos múltiplos não sustentados com o endotélio. Neste estado, os leucócitos estão fracamente aderidos à superfície endotelial por forças que ultrapassam transitoriamente a força de fluxo. O rolamento é mediado pela expressão da CAM + P-selectina.

O rolamento inicial é seguido pela adesão dos leucócitos ao endotélio (leucócitos aderidos) (AFSHAR-KHARGHAN; THIAGARAJAN, 2006) e esta ligação, em processo mediado pelas CAM no endotélio e integrinas nos leucócitos, leva à

sinalização para ativação de outros leucócitos, resultando em adesão mais firme dos leucócitos ao endotélio. Basicamente, o extravasamento de leucócitos (transmigração) se inicia pelo processo de rolamento mediado pelas selectinas e pelas adesões dependentes de integrinas ao endotélio (VAN WETERING; VAN DEN BERK; VAN BUUL; MUL; LOMMERSE; MOUS; TEN KLOOSTER; ZWAGINGA; HORDIJK, 2003).

2.4 FOSFATIDILSERINA

A membrana celular é crucial para a vida da célula, pois define seus limites e mantém as diferenças entre o citoplasma e o ambiente extracelular. Além disso a membrana celular contém proteínas que agem como sensores, respondendo a sinais externos à célula (ALBERTS; JOHNSON; LEWIS; RAFF; ROBERTS; WALTER, 2007).

Todas as membranas celulares possuem estrutura geral semelhante, basicamente uma fina camada de lipídios e proteínas, mantidas unidas por ligações não covalentes.

As moléculas de lipídios são distribuídas em duas camadas com aproximadamente 5 nm de espessura, servindo como barreira à passagem de moléculas solúveis em água. As moléculas de proteínas distribuídas entre a dupla camada lipídica são responsáveis por transporte de moléculas através da membrana e, em alguns casos, servem como receptores que levam sinais químicos para o interior da célula.

Existem quatro fosfolípidos principais na membrana das células de mamíferos: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomielina e FS. Entre elas a única que apresenta carga negativa é a FS, as outras três são eletricamente neutras (ALBERTS, *et al.*, 2007).

A assimetria de membrana é um fenômeno fisiológico importante envolvida em inúmeras funções celulares. Por exemplo, a proteína quinase C (CPK) requer a carga negativa na camada interna da membrana celular para sua atividade. Assimetria de membrana também pode ser um indicativo de morte celular, uma vez

que a FS está normalmente restrita à camada interna da membrana, mas na ocorrência de morte celular é translocada rapidamente para a camada externa.

A estrutura da membrana plasmática é fisiologicamente assimétrica. É composta de uma bicamada de fosfolípidos, sendo a FS confinada à camada citoplasmática (VAJDOVA; GRAF; CLAVIEN, 2002). A isquemia tecidual leva à externalização da FS à camada externa da membrana (HAMMILL; UHR; SCHEUERMANN, 1999), e várias consequências são observadas após a externalização da FS: macrófagos identificam, aderem e destroem células apoptóticas FS-positivas (RAN; DOWNES; THORPE, 2002).

FS é uma molécula que tem recebido atenção especial por ser considerada como uma impressão digital de estresse ou morte celular, por estar expressa na superfície celular apenas nas células submetidas a estresse ou em processo de apoptose. A expressão de FS na superfície celular já foi encontrada em eritrócitos maduros, plaquetas ativadas, macrófagos ativados, células endoteliais de vasos sanguíneos tumorais, células apoptóticas, corpos apoptóticos e micropartículas derivadas de células (SCHUTTERS; REUTELINGSPERGER, 2010).

A exposição da FS na camada externa da membrana sinaliza para algumas células, tais como os macrófagos, que a célula está morta e deve ser fagocitada. Tecidos doentes, tais como placas ateroscleróticas em carótidas de pacientes com ataques isquêmicos transitórios; por outro lado, tem a presença constante de FS da superfície celular como resultado de um desequilíbrio no surgimento e clareamento das células que expressam FS (SCHUTTERS; REUTELINGSPERGER, 2010).

A translocação da FS para o folheto externo da membrana citoplasmática não compromete a função de barreira da membrana. Uma vez no folheto externo, a FS pode participar de uma série de processos, dependendo do tipo e da localização da célula que está expondo FS na sua superfície. FS na superfície dos eritrócitos funciona como sinal indicativo da necessidade de fagocitose pelo sistema reticuloendotelial, o qual remove o eritrócito da circulação por fagocitose (ALLEN; WILLIAMSON; SCHLEGEL, 1988).

Plaquetas que expressam FS na superfície catalizam reações de coagulação que culminam com a formação de trombina (HEEMSKERK; BEVERS; LINDHOUT, 2002). Macrófagos ativados responsáveis pela fagocitose de células mortas também expõem FS na sua superfície. A inibição da exposição de FS nos macrófagos prejudica sua capacidade fagocítica (HAMON; BROCCARDO;

CHAMBENOIT; LUCIANI; TOTI; CHASLIN; FREYSSINET; DEVAUX; MCNEISH; MARGUET; CHIMINI, 2000).

O processo celular mais importante que é acompanhado por expressão de FS na superfície celular é a apoptose, um processo bioquimicamente regulado que promove morte celular programada (HENGARTNER, 2000). Por outro lado, células que morrem pela execução de um programa de morte celular não apoptótico também expressam FS na superfície celular, indicando que a expressão de FS é um fenômeno importante na morte celular no contexto de um organismo multicelular (LEIST; JAATTELA, 2001).

A assimetria fisiológica da camada fosfolipídica dupla da membrana plasmática, com FS confinada à camada citosólica, é mantida por translocases dependentes de ATP (VAJDOVA; GRAF; CLAVIEN, 2002). Parece provável que a depleção de ATP resultante da isquemia tecidual permitiria o desequilíbrio do transportador de FS através da membrana, permitindo que algumas moléculas de FS translocassem para o folheto externo da membrana citoplasmática, podendo, então, desempenhar papel importante na ativação e recrutamento tanto de plaquetas como de células inflamatórias (TEOH; ITO; FIELD; BETHEA; AMR; MCCUSKEY; MCCUSKEY; FARRELL; ALLISON, 2007).

2.5 APOPTOSE

Apoptose é um processo de morte celular, dependente de energia, em que a morte celular ocorre de forma programada. (FRANCISCHETTI; MORENO; SCHOLZ; YOSHIDA, 2010); (LOGUE; GUSTAFSSON; SAMALI; GOTTLIEB, 2005). Desde sua primeira descrição, inúmeras doenças foram relacionadas à apoptose, entre elas a isquemia miocárdica. A isquemia inicia a apoptose, porém a reperfusão é condição necessária para ocorrer apoptose substancial. (GOTTLIEB; BURLESON; KLONER; BABIOR; ENGLER, 1994)

Os mecanismos inflamatórios secundários à reperfusão são complexos, envolvendo tipos de morte celular necróticos e apoptóticos. Vários processos

apoptóticos têm papel central na morte celular após IR (RUDIGER; GRAF; CLAVIEN, 2003).

2.6 ANEXINAS

Anexinas são uma família de 160 proteínas que compartilham a propriedade de ligação a fosfolípidos de carga negativa (fosfatidilserina, fosfatidilcolina e ácido fosfatídico) de maneira dependente do Ca^{++} (BOERSMA; KIETSELAER; STOLK; BENNAGHMOUCH; HOFSTRA; NARULA; HEIDENDAL; REUTELINGSPERGER, 2005). As anexinas são classificadas em cinco grupos (A-E), anexinas do grupo A são anexinas humanas. Existem 12 sub-famílias de anexinas humanas (A1-A11 e A13) que possuem vários papéis intra e extracelulares em vários processos celulares tais como sinalização, transporte, divisão celular e apoptose (DUNCAN; CARPENTER; MAIN; TELFER; MURRAY, 2008); (GERKE; CREUTZ; MOSS, 2005); (GERKE; MOSS, 2002); (HAYES; MOSS, 2004).

Anexina A5 é membro da família das anexinas e, quando presente no sangue e fluidos extracelulares, contribui para a regulação da homeostasia, em particular na circulação placentária, onde interage com a FS presente na superfície das células sinciciotrofoblásticas (REUTELINGSPERGER, 2001).

Existem evidências que mudanças na expressão de anexinas podem contribuir para desenvolvimento de doenças cardiovasculares, câncer, diabetes (HAYES; MOSS, 2004) e distúrbios da coagulação (ZHANG; MCCRAE, 2005).

Anexina A5 tem propriedades antitrombóticas quando ligadas à FS. Entretanto, esta molécula tem tempo de vida curto devido ao seu tamanho (36 kilodaltons), o que permite a rápida eliminação pelos rins (TEOH, *et al.*, 2007).

Os processos em que as anexinas estão envolvidas tem sido cada vez mais descritos. As propriedades antiinflamatórias da anexina A1, o papel anti-fibrinolítico da anexina A2 e a ação antitrombótica da anexina A5 são bem estabelecidos (CHINNI; TISCIA; COLAIZZO; VERGURA; MARGAGLIONE; GRANDONE, 2009); (HAJJAR; GUEVARA; LEV; DOWLING; CHACKO, 1996); (HAYES; MOSS, 2004)

Dianexina é um novo fármaco da família das anexinas, que apresenta inúmeros potenciais de aplicações em vários campos da Medicina. Consiste de um

homodímero da anexina A5 criado por meio de tecnologia de recombinação do DNA (SHEN; KE; ZHAI; TSUCHIHASHI; GAO; DUARTE; COITO; BUSUTTIL; ALLISON; KUPIEC-WEGLINSKI, 2007)

Dianexina tem afinidade maior pela FS do que a anexina A5. O tempo de meia vida é de 6.5 horas, superior aos 20 minutos da anexina A5.

Vários fatores da coagulação (X, Xa, e Va) utilizam a FS externalizada como ponto de ligação. Já foi demonstrado que a anexina A5 compete pela ligação à FS, prevenindo a ativação destas enzimas (HARRIS; PIERANGELI, 1996).

A fosfatidilserina externalizada é também local de ligação para fosfolipase A2, produzida em processos inflamatórios (BILLY; SPEIJER; ZWAAL; HACK; HERMENS, 2002), que também induzem agregação plaquetária e trombose.

Em estudo com modelo de IR hepática (SHEN, *et al.*, 2007) dianexina preservou o fluxo sanguíneo na microcirculação e a integridade do hepatócito durante a reperfusão, verificado por microscopia *in vivo*, concluindo que se trata de fármaco seguro que leva à proteção do hepatócito e prevenção do recrutamento inflamatório na microcirculação.

A isquemia tecidual causa danos às células endoteliais. No processo de reperfusão, células sanguíneas são ativadas e ligam-se ao endotélio lesado, onde iniciam efeitos pró-inflamatórios e pró-coagulantes, particularmente pelo recrutamento de outros tipos celulares, tais como leucócitos e plaquetas. Este recrutamento reduz o fluxo sanguíneo na microcirculação do tecido e exacerba a lesão causada pela isquemia. Postula-se que o mecanismo de ação da dianexina inclui a melhora das alterações da microcirculação causadas pela aderência de leucócitos e plaquetas às células endoteliais danificadas após IR (TEOH, *et al.*, 2007).

2.7 MICROCIRCULAÇÃO

Define-se microcirculação como a circulação de sangue contida entre as arteríolas e vênulas. O papel da microcirculação é prover O₂ e nutrientes para os tecidos e remover dióxido de carbono (CO₂). É a única estrutura capaz de realizar esta função. A microcirculação é a estrutura vascular composta de arteríolas,

capilares, vênulas pós-capilares e vênulas (FIGURA 1). Cerca de 5% do sangue circulante está nos capilares.

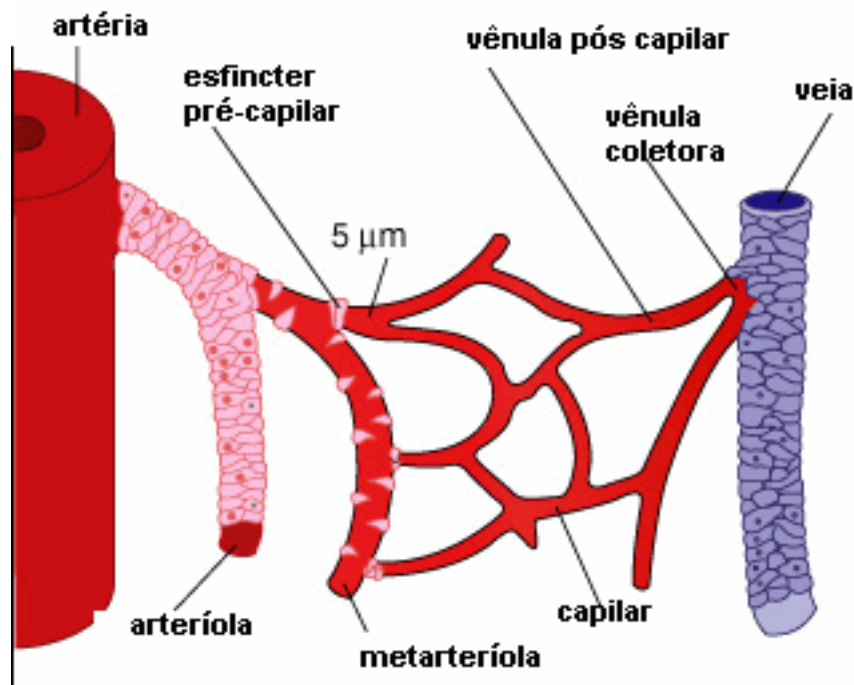


FIGURA 1 – ESTRUTURA DA MICROCIRCULAÇÃO - demonstração das anastomoses capilares entre os sistemas venoso e arterial.

FONTE: alterada pelo autor (2011)

As arteríolas são o principal foco de resistência ao fluxo sanguíneo, e pequenas variações nestas estruturas levam a grandes alterações da resistência periférica local.

As arteríolas se dividem em vasos menores, as metarteríolas que, por sua vez, drenam nos capilares. Entre as metarteríolas e os capilares existem esfíncteres pré-capilares, compostos por musculatura lisa. Embora estes esfíncteres não sejam inervados, eles respondem a substâncias vasoconstritoras circulantes.

A área total dos capilares excede 6000 m² no adulto. Capilares são estruturas de 5 µm de diâmetro junto à terminação arterial e 9 µm na terminação venosa. O diâmetro dos capilares é suficiente para permitir que os eritrócitos passem em fila única, já que estas células possuem entre 6 a 8 µm de diâmetro, enquanto os leucócitos medem entre 12-16 µm.

As paredes dos capilares são formadas apenas por células endoteliais, medindo 1 μm de espessura. As junções entre as células endoteliais permitem a passagem de moléculas entre 10 ηm e 100 ηm , dependendo do tecido. O tecido com a menor junção entre as células endoteliais é o cérebro, já no fígado estas junções são extremamente porosas, permitindo a passagem de moléculas de grande diâmetro.

O endotélio se localiza fisicamente entre o sangue circulante e a adventícia ou a túnica média dos vasos. O conjunto das células endoteliais se caracteriza como um órgão de grande extensão e importante pela capacidade de responder a mediadores inflamatórios e outras substâncias circulantes, além de alterações de fluxo. O endotélio ainda é capaz de secretar hormônios de crescimento e substâncias vasoativas (GANONG, 2010).

2.7.1 Modelos experimentais do estudo da microcirculação

Vários modelos para estudo *in-vivo* para estudo da microcirculação foram desenvolvidos, entre eles orelha de coelho, asa de morcego, mesentério de rato e camundongo, porém o retalho mais comumente utilizado é o retalho do músculo cremaster de ratos, por se tratar de um modelo consistente e reprodutível (SIEMIONOW; ARSLAN, 2004).

2.7.1.1 Músculo cremaster de ratos

A utilização do músculo cremaster de ratos tem origem relativamente recente. A primeira descrição foi em 1961, e analisou os efeitos da histamina e serotonina na permeabilidade vascular (MAJNO; PALADE, 1961).

O retalho do músculo cremaster é baseado na artéria púlico-epigástrica, que tem origem na artéria ilíaca, proximalmente ao ligamento inguinal. Em sua porção distal dá origem a um ou dois ramos para o músculo cremaster. Este vaso é

denominado artéria espermática externa pelos anatomistas e arteríola A1 pelos estudiosos da microcirculação (ANDERSON; ACLAND; SIEMIONOW; MCCABE, 1988). A veia púlico-epigástrica acompanha a artéria e drena para a veia íliaca. A inervação sensitiva e motora é dada pelo nervo genitofemoral (FRANKEN; PETER; ANDERSON; WANG; WERKER; SCHUSCHKE; KON; BARKER, 1996).

A espessura do retalho, entre 200 e 400 μm , permite a transiluminação deste e observação da microcirculação. A dissecação cirúrgica do músculo cremaster permite ao investigador o controle do fluxo sanguíneo para o retalho, já que não há fluxo sanguíneo colateral (ANDERSON, *et al.*, 1988). A principal vantagem do músculo cremaster é sua similaridade aos outros músculos estriados (BAEZ, 1973); (GRANT, 1964).

Em 1988 o retalho foi descrito em ilha, completamente isolado de seu pedículo neurovascular (ANDERSON, *et al.*, 1988). Este retalho permite o estudo da microcirculação em relação à reatividade dos vasos (BANBURY; SIEMIONOW; PORVASNIK; PETRAS; ZINS, 1999); (GURUNLUOGLU; LUBIATOWSKI; GOLDMAN; CARNEVALE; SIEMIONOW, 2002); (KRAPOHL; SIEMIONOW; PIZA; PIERAMICI; ZINS, 1999); (NANHEKHAN; SIEMIONOW, 2003); (SIEMIONOW; NANHEKHAN, 1999), lesão de IR (AYHAN; TUGAY; NORTON; ARANEO; SIEMIONOW, 2003); (LOHMAN; YOWELL; BARTON; ARANEO; SIEMIONOW, 1997); (SIEMIONOW; MANIKOWSKI; GAWRONSKI, 1995); (SIEMIONOW; ROMANOWSKI; LISTER, 1993); (TUREGUN, *et al.*, 1999), e monitorização da resposta microvascular a transplantes (GUDEMEZ; TUREGUN; ZINS; SIEMIONOW, 1998); (KRAPOHL; ZINS; SIEMIONOW, 2000); (OZER; ADANALI; ZINS; SIEMIONOW, 1999); (OZER; ZIELINSKI; SIEMIONOW, 2003); (OZER; ZIELINSKI; UNSAL; SIEMIONOW, 2002); (SIEMIONOW; DEMIRKAN; ROCKWELL; LISTER, 1997); (SIEMIONOW; OZER; PORVASNIK; ZINS, 2000).

Este modelo foi usado inúmeras vezes (LEE; WEI; LEE; SU, 2000); (WANG; ANDERSON; FLEMING; PETER; FRANKEN; ACLAND; BARKER, 1997); (WANG; FANG; STEPHESON; KHIABANI; ZAMBONI, 2005) para estudos de IR, se tratando de modelo estabelecido para o estudo de fármacos e terapias.

2.7.2 Microscopia Intravital

A microscopia intravital é a base do estudo da microcirculação. Antes do desenvolvimento deste método de avaliação *in vivo*, somente técnicas histológicas permitiam a análise da microcirculação. Entretanto estes métodos não forneciam informações precisas sobre a hemodinâmica da rede de microcirculação, que está em constante transformação.

2.7.3 Avaliação hemodinâmica

A avaliação hemodinâmica da microcirculação é realizada mediante transiluminação do tecido estudado, que deve ser posicionado entre uma fonte de luz e o microscópio. A técnica só pode ser utilizada em tecidos finos, que permitam que a luz atravesse o tecido.

Por definição a interação leucócito endotelial é quantificada pelos seguintes critérios (BANBURY; SIEMIONOW; PORVASNIK; PETRAS; BROWNE, 2000); (SIEMIONOW; MOREIRA-GONZALEZ, 2005):

- leucócito em rolamento (aquele que se movimenta mais lentamente que a coluna de sangue)
- leucócito aderido (aquele que se adere ao endotélio por período de no mínimo 20 segundos)
- leucócito transmigrado (aquele que atravessa o endotélio em direção ao interstício)

2.7.4 Avaliação de permeabilidade

A barreira endotelial microvascular regula a troca de macromoléculas, como albumina e nutrientes, entre o plasma sanguíneo e o fluido extracelular. A permeabilidade é determinada pela integridade das junções entre as células endoteliais (VOGEL; EASINGTON; MINSHALL; NILES; TIRUPPATHI; HOLLENBERG; PARRILLO; MALIK, 2001). A regulação da função da barreira

endotelial é crítica para a homeostase vascular. A formação de espaços entre células endoteliais adjacentes, em processo isquêmicos por exemplo, leva a exposição da membrana basal à proteínas do plasma. Em situações fisiológicas este processo é altamente regulado e reversível, porém em situações patológicas ocorre o recrutamento de leucócitos e plaquetas que mantêm estes espaço abertos e retarda a recuperação de processos patológicos (WEIS, 2008).

A avaliação da permeabilidade é realizada mediante epi-iluminação e corantes fluorescentes, e utiliza filtro para um comprimento de onda específico para excitar o corante fluorescente. A excitação faz o corante emitir fótons que podem ser observados ao microscópio. Como não é necessário emitir luz através do tecido, pode ser utilizado em tecidos sólidos, como fígado e cérebro (HARRIS; SINITSINA; MESSMER, 2002).

O transporte transvascular de proteínas marcadas é utilizada para o estudo de permeabilidade em ratos e camundongos. São utilizados radioisótopos, como a albumina I^{125} , ou corantes como a albumina marcada com azul de Evans, albumina ligada à fluoresceína isotiocianato (FITC-a), dextran ligada à fluoresceína isotiocianato (FITC-d) (LANGER; GOERTZ; STEINSTRAESSER; KUHNEN; STEINAU; HOMANN, 2005). A FITC-a foi usada em diversas situações: para a determinação de fluxo de albumina na circulação pulmonar de ratos e camundongos (BOUTOILLE; MARECHAL; PICHENOT; CHEMANI; GUERY; FAURE, 2009).

Em comparação com a albumina I^{125} , a FITC-a se mostrou vantajosa pela não necessidade de manipulação e armazenamento de radioisótopos, e apresenta a mesma acurácia da albumina I^{125} (BOUTOILLE, *et al.*, 2009).

A microscopia fluorescente intravital pode ainda fornecer informações sobre as interações dos leucócitos com o endotélio, já que o uso de rodamina 6G leva à marcação dos leucócitos (LANGER, *et al.*, 2005).

3. MATERIAL E MÉTODO

Os procedimentos experimentais do presente estudo foram realizados no laboratório de Microcirurgia do Departamento de Cirurgia Plástica da Cleveland Clinic, Cleveland, OH, EUA. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê para uso de animais da mesma instituição. Aplicaram-se as Normas para Apresentação de Documentos Científicos da Universidade Federal do Paraná (CARNEIRO, 2007).

3.1 AMOSTRA

Foram utilizados 53 ratos Lewis machos, saudáveis, pesando entre 100 e 150g, entre 6 e 7 semanas de idade, para garantir que a espessura do músculo cremaster não ultrapassasse 200 μ m para permitir que a microcirculação pudesse ser observada através de transiluminação.

3.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

3.2.1 Anestesia

Os animais foram anestesiados com injeções subcutâneas de 6mg/kg de xylazina, 1mg/kg de acepromazina e 30mg/kg de ketamina. Foi realizada suplementação anestésica com as mesmas drogas na dose de 2mg/kg de xylazina, 0,3mg/kg de acepromazina e 10mg/kg de ketamina a cada 1 hora passada do procedimento.

3.2.2 Preparo pré-operatório

Todos os animais foram submetidos a tricotomia da região abdominal e membro inferior direito com máquina de tricotomia, seguida de limpeza com sabão neutro. Em seguida foram posicionados em decúbito dorsal em prancheta cirúrgica e mantidos em posição com fita adesiva.

3.2.3. Dissecção Cirúrgica do Músculo Cremaster

Foi realizada incisão inguinal à direita e o músculo cremaster foi cuidadosamente separado da bolsa escrotal (FIGURA 2). A dissecção foi realizada sob magnificação de 12-30x (ZEISS OPMI S3, Zeiss, Alemanha).



FIGURA 2 – DISSECÇÃO DO MÚSCULO CREMASTER – Exposição do músculo cremaster na região inguinal direita.

FONTE: O autor (2011)

A seguir, o músculo foi incisado em toda a sua espessura em sua parte anterior e o testículo e cordão espermático foram ressecados, resultando em retalho redondo em ilha com padrão de vascularização axial. O músculo então foi isolado juntamente com seu pedículo, os vasos púbico-epigástricos, até a origem destes nos vasos ilíacos (FIGURA 3). Desta forma o músculo cremaster ficou conectado ao animal apenas pelos vasos púbico-epigástricos e pelo nervo genitofemoral, que neste momento foi seccionado.

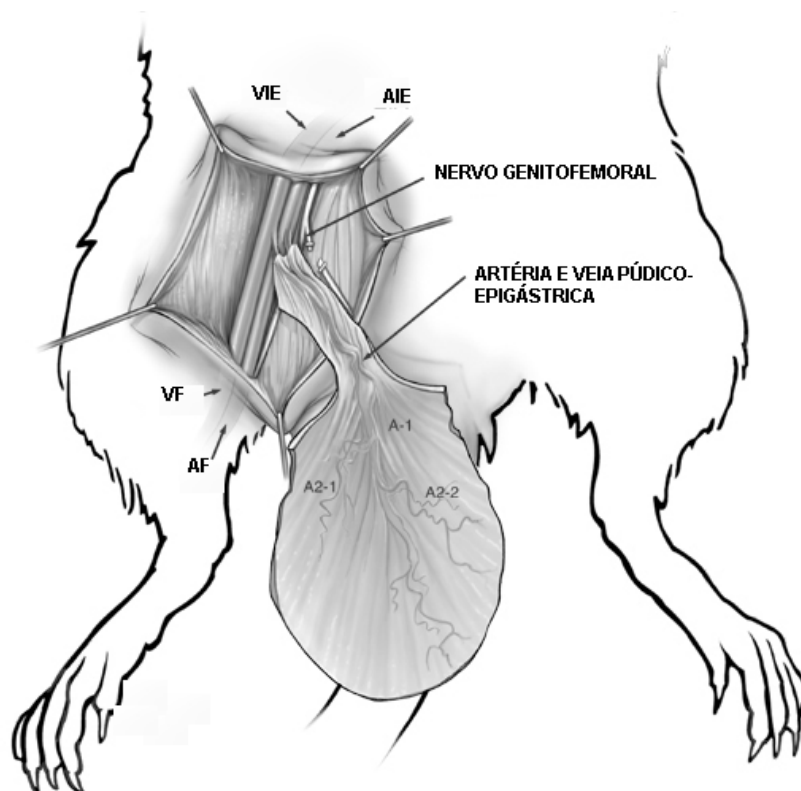


FIGURA 3 – ESQUEMA DOS VASOS NA DISSECÇÃO DO MÚSCULO CREMASTER – Exposição da região inguinal. Vasos dissecados: VF- veia femoral; AF – artéria femoral; VIE – veia ilíaca externa; AIE – artéria ilíaca externa. Abertura do músculo em sua porção anterior resultando em retalho em ilha. Padrão de vascularização axial . A-1 – arteríola principal do retalho; A2-1 – arteríola de 1ª ordem ; A2-2 - arteríola de 2ª ordem.

FONTE: O autor (2011)

O animal foi então preso à uma câmara de Plexiglas, especialmente desenvolvida (FIGURA 4), e o músculo cremaster foi tracionado sobre a câmara e fixado com fios de seda 6-0. O retalho foi mantido úmido com Solução de Ringer e

coberto com película de plástico impermeável. A temperatura foi mantida entre 35 e 37°C.

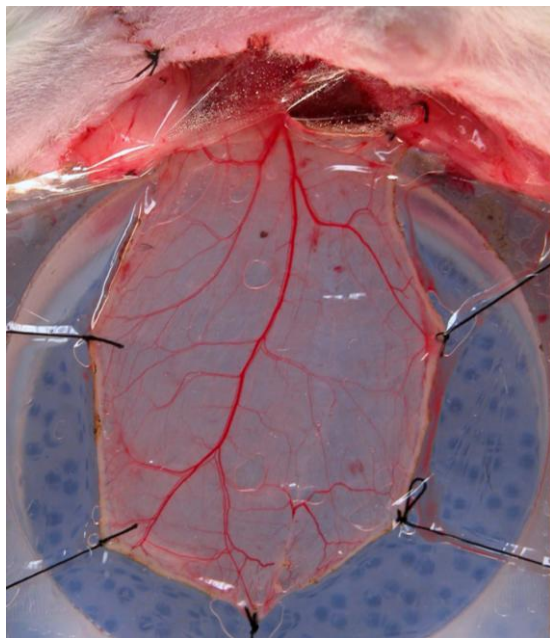


FIGURA 4 – MÚSCULO CREMASTER EM ILHA – abertura do músculo cremaster em sua porção anterior e fixação à câmera de plexiglass com 5 pontos de fio de seda 6-0 para evitar contração muscular

FONTE: O autor (2011)

Nos grupos em que foi necessário o clampeamento, este foi realizado com clampes microvasculares nos vasos ilíacos e femorais (FIGURA 5).

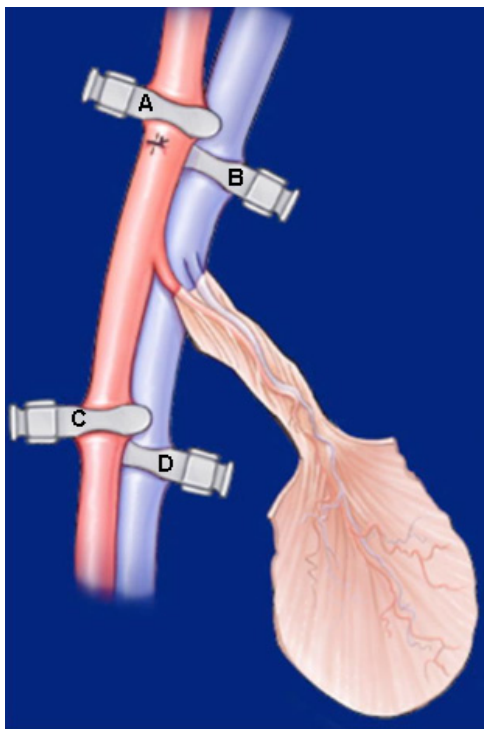


FIGURA 5 – ESQUEMA DE COLOCAÇÃO DE CLAMPES – diagrama expondo a colocação de 4 clampes individuais nos vasos ilíacos externos (A – artéria ilíaca externa e B – veia ilíaca externa) nos vasos femorais (C – artéria femoral e D – veia femoral)

3.2.4. Dissecção da região cervical

Após dissecção do músculo cremaster, foi realizada incisão paramediana na região cervical esquerda e isolamento da veia jugular esquerda (FIGURA 6), que foi utilizada para administração intravascular de dianexina ou placebo.

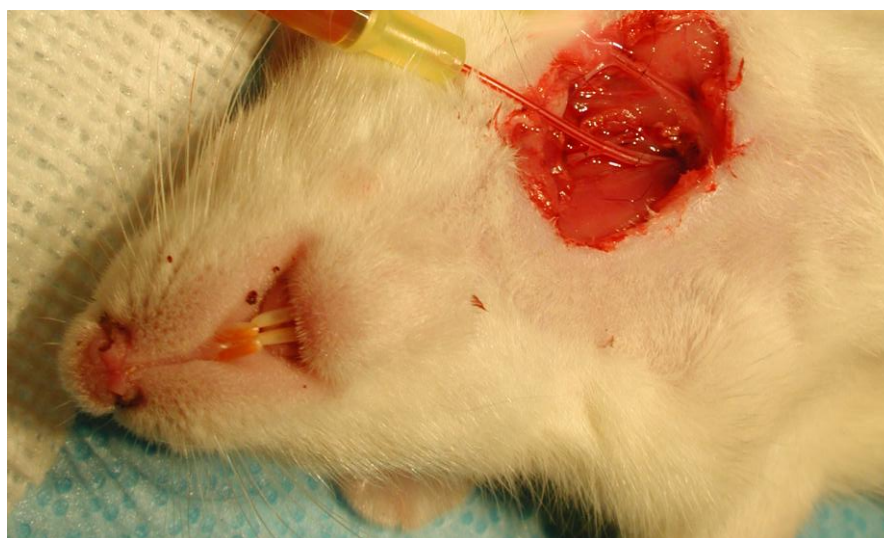


FIGURA 6 – ACESSO VASCULAR – Fotografia demonstrando dissecação da veia jugular através de acesso paramediano e cateterização com Intracath 24Fr.

FONTE: O autor (2011)

3.2.5. Controle do meio externo

A temperatura do animal foi mantida entre 36-37 °C e foi monitorizada por sonda retal durante todo o período do experimento, mediante controle da temperatura da sala e restrição de acesso ao ambiente.

Foi também monitorizada a oxigenação tecidual (mediante sonda de oxigenação tecidual (Lycot, Integra, NJ, EUA), que foi posicionado sob o retalho durante todo o período de observação.

Durante o período de 4 horas de observação os animais receberam hidratação mediante administração de 3 ml de SSI 0.9% via subcutânea.

3.2.6. Eutanásia dos animais

Após o término do experimento, após a última avaliação hemodinâmica, os animais foram mortos por dose letal de ketamina e xylazina.

3.3. DELINEAMENTO DOS GRUPOS

Os 53 animais foram divididos aleatoriamente por sorteio em 4 grupos, que por sua vez foram subdivididos em 2 grupos, de acordo com o método de avaliação a que foram submetidos, avaliação hemodinâmica (H) ou avaliação de permeabilidade (P), uma vez que o mesmo animal não pode ser avaliado pelos 2 métodos.

Grupo CONTROLE – Controles não-isquêmicos

É o grupo controle em que não há clampeamento do pedículo.

Grupo PLACEBO – Controle de isquemia de 2 horas

Este grupo avalia as alterações da microcirculação no retalho muscular após 2 horas de isquemia. O pedículo vascular foi clampeado por 2 horas para provocar isquemia. Após os clampes serem liberados o retalho foi observado. Foi administrado placebo, solução salina isotônica (SSI), na dose de 2,5 ml/kg, via jugular.

Grupo PRÉ – Isquemia de 2 horas com administração de dianexina antes da isquemia:

Foi administrada dianexina (ALAVITA, CA, EUA) na dose de 100 µg/kg endovenoso via jugular 10 minutos antes do clampeamento do pedículo. Foi realizada diluição em solução salina isotônica, cada ml continha 50 µg de dianexina. Este grupo foi utilizado para avaliar as alterações da microcirculação no retalho muscular quando dianexina é administrada antes da isquemia.

Grupo PÓS - Isquemia de 2 horas com administração de dianexina após a isquemia

Foi administrada dianexina (Alavita, CA, EUA) na dose de 100 µg/kg endovenoso via jugular 10 minutos após a liberação dos clampes. Este grupo foi utilizado para avaliar as alterações da microcirculação no retalho muscular quando dianexina é administrada a o período isquêmico.

Foram utilizados 53 animais de acordo com o fluxograma abaixo (FIGURA 7).

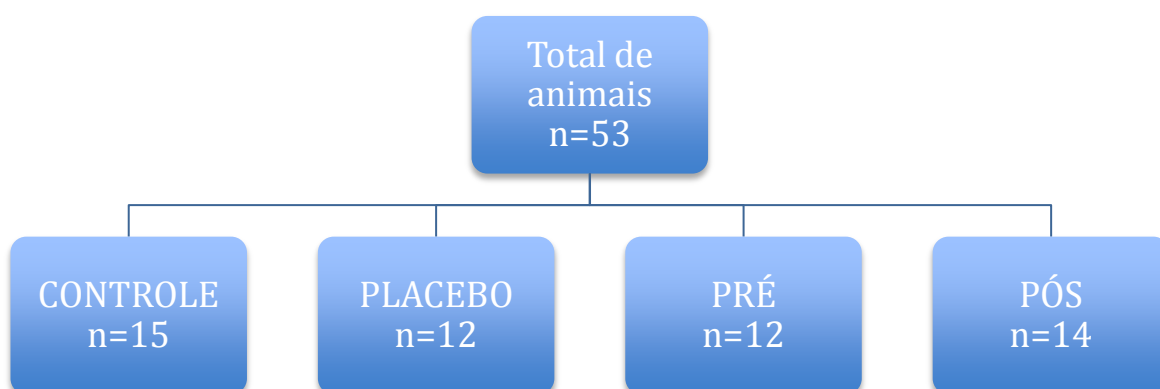


FIGURA 7 – FLUXOGRAMA DA DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS. CONTROLE (P=8, H= 7) PLACEBO (P=6, H=6) PRÉ (P=6, H=6) E PÓS (P=7, H=7) (P=AVALIAÇÃO DE PERMEABILIDADE E H=AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA)

3.4. MEDIDAS DE AVALIAÇÃO

3.4.1. Microscopia intravital/ Avaliação hemodinâmica

O retalho do músculo cremaster foi transiluminado por uma lâmpada de tungstênio por baixo do retalho e a avaliação hemodinâmica foi feita mediante

microscopia intravital (observação *in vivo* da microcirculação através de um microscópio (Nikon Optiphot-2, Nikon Corporation, Tokio, Japão) equipado com câmera colorida que capturou a imagem do retalho (CCDIRIS, Sony, Japão) conectada com monitor 19" (Sony Trinitron, Sony, Japão) e gravador de vídeo SVHS (AG-1730, Panasonic, Japão) e cartão de captura de PC foram utilizados para a observação (FIGURA 8). A magnificação obtida é de 135x a 1800x. Os dados foram analisados em tempo real e o vídeo foi arquivado.

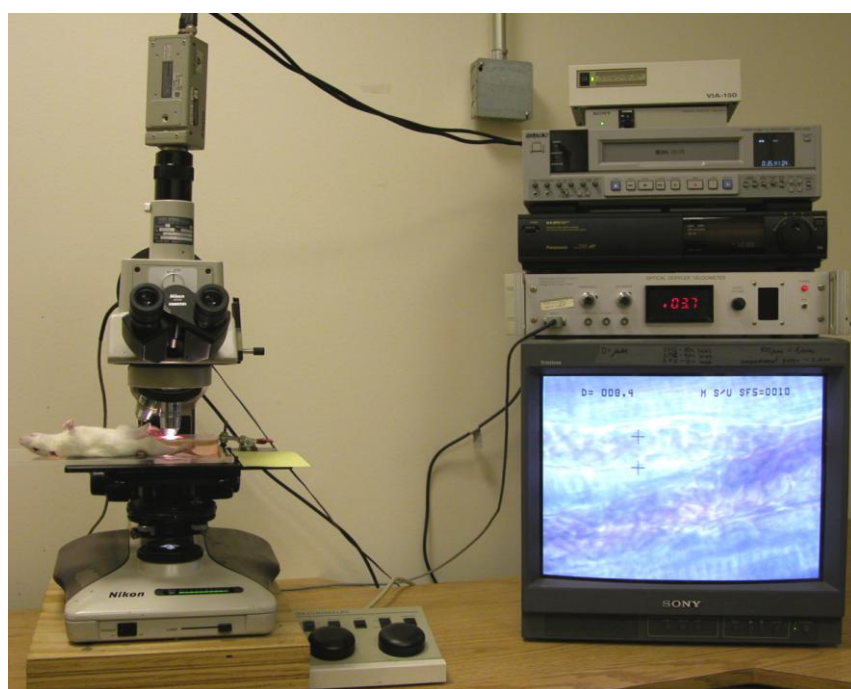


FIGURA 8 - FOTOGRAFIA QUE DEMONSTRA O SISTEMA PARA AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA - O animal é colocado sob o microscópio equipado com câmera colorida e conectada a monitor e gravador de vídeo.

FONTE: O autor (2011)

Em todos os grupos foram realizadas observações hemodinâmicas nos seguintes momentos :

- 0 -10 minutos depois da dissecação do retalho em todos os grupos
- 2,3 e 4 horas após a dissecação do retalho no grupo controle (grupo sem clampeamento) ou após a liberação dos clampes nos grupos placebo, PRÉ e PÓS.

Os seguintes parâmetros foram avaliados:

3.4.1.1 Diâmetros

Foram obtidas medidas de diâmetro da vênula principal (V1) e arteríola principal (A1), e da arteríola de 1ª e 2ª ordem A2-1 e A2-2, e seus ramos A3-1 e A3-2 mediante vídeo micrômetro adaptado ao sistema de vídeo (VIA 150, Boeckeler, Tucson, AZ, EUA), com objetiva de 20x (FIGURA 9).

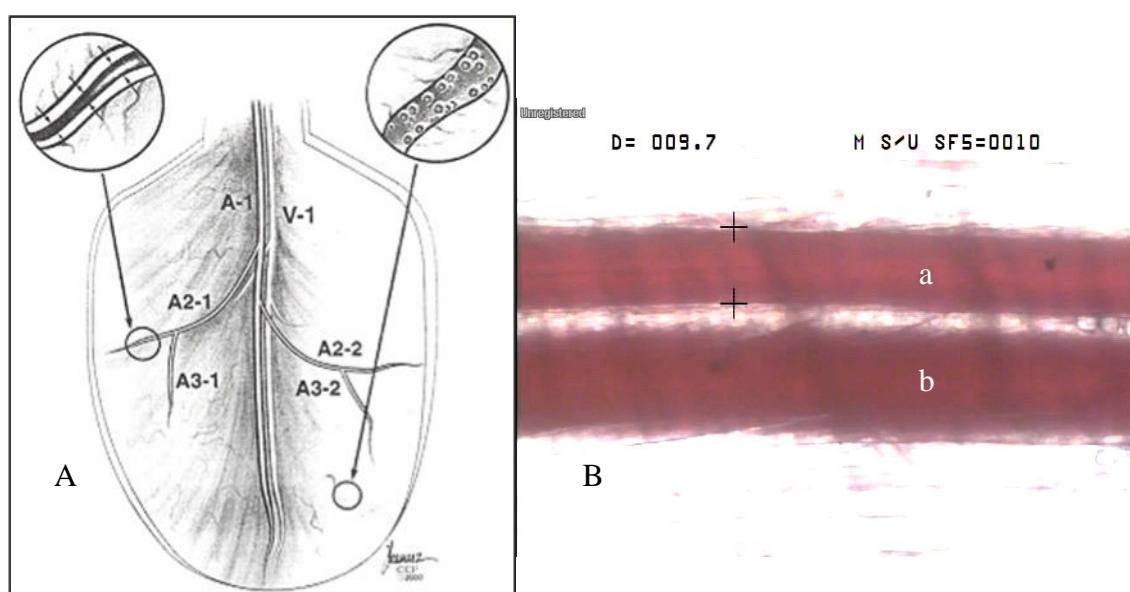


FIGURA 9 – A. ESQUEMA DEMONSTRANDO OS VASOS ANALISADOS NO ESTUDO (A-1: arteríola principal; A2-1: arteríola de 1ª ordem; A2-2: arteríola de 2ª ordem; A3-1: ramo da arteríola de 1ª ordem; A3-2: ramo da arteríola de 2ª ordem. B. FOTOMICROGRAFIA (AUMENTO DE 20X) DEMONSTRANDO: a. Arteríola principal, e b. Vênula principal.

FONTE: O autor (2011)

3.4.1.2 Índice de Edema

O índice de edema foi calculado mediante vídeo micrômetro adaptado ao sistema de vídeo (VIA 150, Boeckeler, Tucson, AZ, EUA), com objetiva de 20x. O índice de edema foi obtido para determinar extensão da obstrução do lúmen da vênula pós-capilar causada pela agregação leucocitária.

O índice de edema é calculado mediante a seguinte fórmula: medida do

diâmetro externo (DE) e do diâmetro interno (DI) da vênula pós-capilar $(DE - DI)/DE$ (SIEMIONOW; MOREIRA-GONZALEZ, 2005).

3.4.1.3 Velocidade de Fluxo Sanguíneo

Foi quantificada a velocidade do fluxo de hemácias em mm/s da V1 e A1 e da arteríola de 1ª e 2ª ordem A2-1 e A2-2, e seus ramos A3-1 e A3-2, mediante doppler velocímetro acoplado a vídeo (Texas A&M, College Station, TX, EUA) (FIGURA 10).

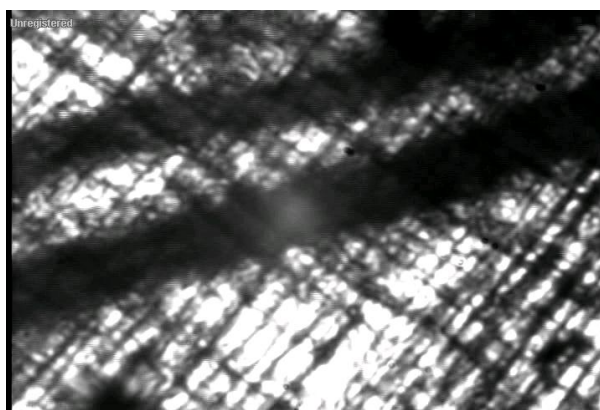


FIGURA 10 – FOTOMICROGRAFIA DURANTE OBTENÇÃO DA VELOCIDADE DEO FLUXO DAS HEMÁCIAS PELO DOPPLER VELOCÍMETRO SOBRE A ARTERÍOLA DE 2ª ORDEM

FONTE: O autor (2011)

3.4.1.4 Interação leucócito endotelial (ILE)

Foram selecionadas aleatoriamente 6 vênulas pós-capilares (2 vênulas pós-capilares em cada parte do retalho; proximal, média e distal) entre 20 e 40 μm . Em seguida foram determinados o número de leucócitos em rolamento (aqueles que se movimentam mais lentamente que a coluna de sangue), aderidos (aqueles que se aderem ao endotélio por um período de no mínimo 20 segundos) e transmigrados (aqueles que atravessam o endotélio em direção ao interstício). Foram quantificados por período de 2 minutos em cada vaso (6 vasos avaliados), com objetiva de 40x (FIGURA 11).

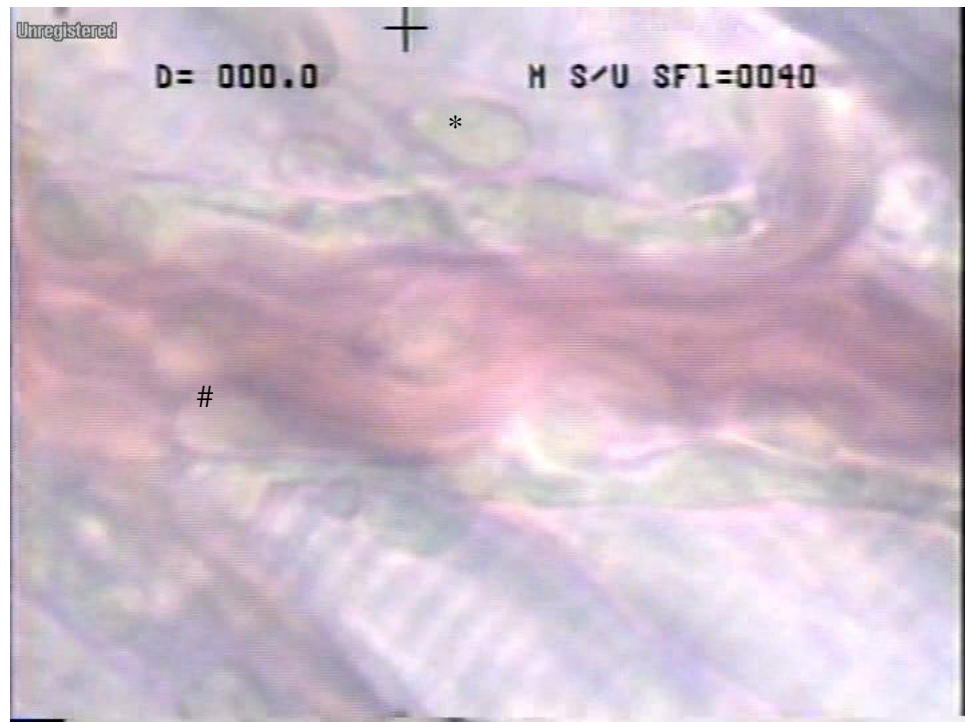


FIGURA 11 – FOTOMICROGRAFIA DA VÊNULA PÓS-CAPILAR OBTIDA SOB MAGNIFICAÇÃO DE 40X. LEGENDA: # leucócitos aderidos ao endotélio e *leucócitos transmigrados que atravessaram o endotélio

FONTE: O autor (2011)

3.4.1.5 Densidade dos capilares

O número de capilares abertos (i.e. com fluxo constante) nas três regiões do retalho (proximal, média e distal) foi determinado mediante contagem de 9 regiões adjacentes em cada parte do retalho, área de $0,18 \text{ mm}^2$ (total de 27 áreas avaliadas) para definir a densidade capilar, com objetiva de 20X (FIGURA 12).

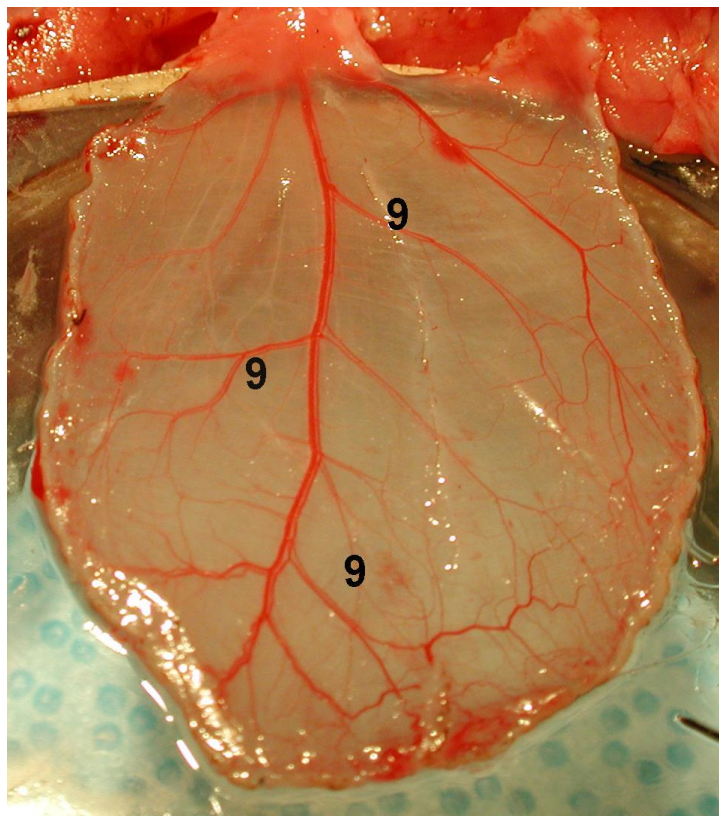


FIGURA 12 – FOTOGRAFIA DO RETALHO POSICIONADO NA CÂMARA DE PLEXIGASS. O número 9 indica a quantidade de áreas observadas em cada retalho para verificação do número de capilares abertos (9 áreas na porção proximal, 9 áreas na porção média e 9 áreas na porção distal – total de 27 áreas).

FONTE: O autor (2011)

3.4.2. Microscopia intravital - Avaliação de permeabilidade

Para avaliação da permeabilidade mediante microscopia intravital foi utilizado microscópio fluoresceínico Zeiss 20T (Carl Zeiss, Alemanha) equipado com lâmpada de mercúrio (Mercury Power Supply, Model 1200, OpticQuip, NY, EUA) e filtro banda de excitação de luz azul de 460 a 490 nm. O sistema de registro de imagem consiste de câmera intensificadora de silicone MTI (MTT SIT-68, Sony, Toquio, Japão), gravador de vídeo (AG-1290; Panasonic, Toquio, Japão), e computador PC com placa dedicada para aquisição de imagens imunofluorescentes.

Esta avaliação foi realizada mediante administração de FITC albumina (isotiocianato de fluoresceína associado a albumina) (Sigma-Aldrich, MO, EUA), na

dose de 0.2 ml de FITC albumina por 100 g peso do animal.

FITC albumina é uma albumina ligada um agente fluoroluminescente. Esta albumina foi administrada no intravascular através da veia jugular esquerda, a qual foi dissecada em todos os animais.

Foram avaliados vasos únicos, vênulas pós-capilares entre 25 e 35 μm de diâmetro. A FITC-albumina foi estimulada pela lâmpada de mercúrio através do filtro de excitação. A FITC-albumina aparece como coluna branca sobre fundo preto, e o extravasamento da FITC-albumina é demonstrado por riscos brancos fora do lúmen do vaso.

Foram obtidas imagens através da câmera monocromática AxioCam MRm digital (Carl Zeiss, Alemanha) e gravadas no computador PC acoplado. As imagens foram analisadas e a densidade ótica do interior do vaso e de seu limite externo foi medida com o software Image PRO-Plus software (version 4.5.1.22., Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA) (FIGURA 13).

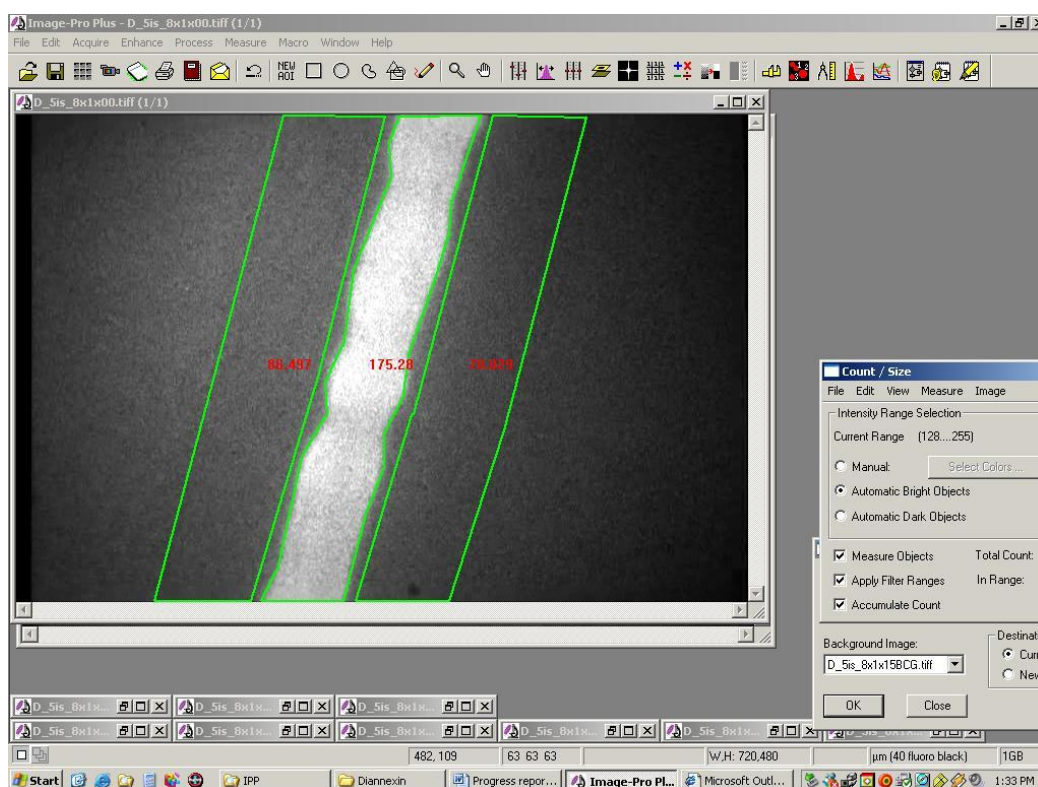


FIGURA 13 – IMAGEM DO SOFTWARE IMAGE PROPLUS OBTIDA COM A CÂMERA AXIOCAM MRm DIGITAL (Carl Zeiss, Alemanha) DA VÊNULA PÓS-CAPILAR APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE FITC-ALBUMINA. São obtidas medidas de densidade ótica dentro do lúmen do vaso e também nas laterais adjacentes ao vaso

FONTE: O autor (2011)

Todas as medidas foram feitas para estabelecer lesão endotelial e para determinar a influência da dianexina na permeabilidade vascular. Um alto índice de extravasamento sugere aumento da permeabilidade capilar como resultado de lesão endotelial.

Foram feitas 3 medidas de densidade ótica para cada vaso, uma medida do interior do vaso e 2 medidas do exterior do vaso (interstício) (FIGURA 14). O mesmo vaso foi avaliado em todos os momentos de avaliação.

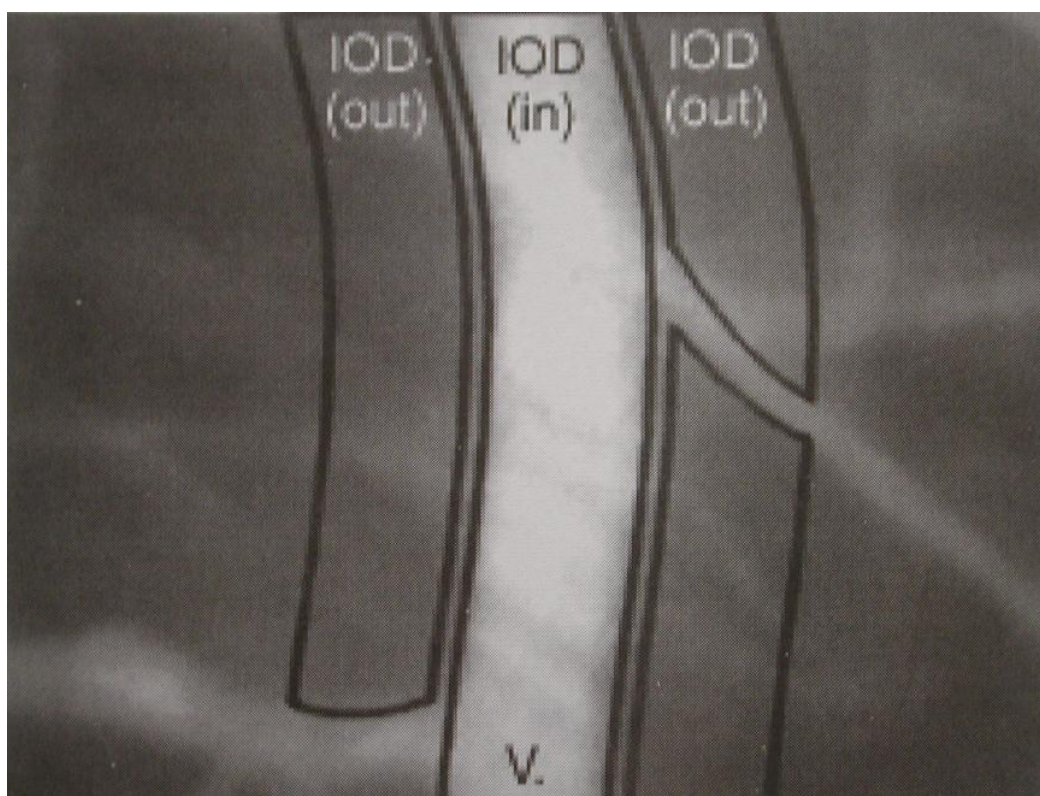


FIGURA 14 – FOTOMICROGRAFIA OBTIDA COM A AXIOCAM MRm (Carl Zeiss, Alemanha) PARA A OBTENÇÃO DAS MEDIDAS DE DENSIDADE ÓTICA. Legenda: densidade ótica de dentro (in) e fora (out) do vênula pós-capilar. Este mesmo vaso foi avaliado nos demais momentos. Estes valores foram utilizados para o cálculo do índice de permeabilidades (IP).

FONTE: O autor (2011)

O índice de permeabilidade (IP) foi calculado dividindo-se o valor de densidade no interstício pela densidade no interior do vaso. Quanto maior o IP maior o extravasamento pela parede do vaso, e maior a lesão endotelial.

Estas observações foram realizadas em 5 diferentes momentos, em intervalos de 15 minutos, em todos os grupos:

- 0, 15, 30, 45 e 60 minutos depois da liberação dos clampes nos grupos placebo, PRÉ e PÓS
- 0, 15, 30, 45 e 60 minutos após 2 horas da dissecação do retalho no grupo controle.

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para cada animal, medidas de densidade capilar, índice de edema e contagem de leucócitos foram realizadas nas regiões proximal, média e distal. Velocidade e diâmetro foram realizadas nas veias e arteríolas. Quatro medidas foram realizadas em tempos específicos para avaliar as mudanças ao longo do tempo após isquemia de 2 horas. Para avaliar o padrão de mudança ao longo do tempo o teste de ANOVA foi realizado de forma repetida, realizando análise separadamente por tempo de isquemia. Foi usada estrutura de correlação autorregressiva para medidas no mesmo animal, porque forneceu o melhor modelo. Nos modelos, cada medida hemodinâmica foi usada como resposta variável. O índice de permeabilidade foi calculado para cada fotomicrografia. Para estas medidas foram calculadas médias dentro de cada tempo avaliado para criar a média do índice de permeabilidade em cada tempo para cada animal. Dentro de cada grupo, o índice de permeabilidade foi resumido em cada tempo avaliado usando média e erro padrão. A média dos níveis de permeabilidade em cada tempo avaliado foi comparada entre os grupos usando modelos de análise de variância (ANOVA) separadamente para os grupos. O teste “t” foi utilizado para comparação entre os grupos

Todas as análises foram realizadas utilizando o software SAS (version 9.1; Cary, NC, EUA). Foi adotado nível de confiança de 95% em todas as análises estatísticas. Dados são expressos como média (M) \pm erro padrão (EP).

4. RESULTADOS

4.1. AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA

4.1.1. Diâmetro dos vasos

Foram comparadas as medidas dos diâmetros da vênula (V1) e arteríola (A1) principais do retalho e também as arteríolas de 1ª e 2ª ordem e seus ramos em diferentes períodos (0,2,3 e 4h).

Não foram observadas diferenças entre os diâmetros das vênulas em cada grupo ao longo do tempo (GRÁFICO 1), porém na avaliação do diâmetro da arteríola principal (A1) observaram-se valores menores nos grupos PRÉ e PÓS, quando comparadas ao grupo CONTROLE ($p \leq 0,05$) (GRAFICO 2).

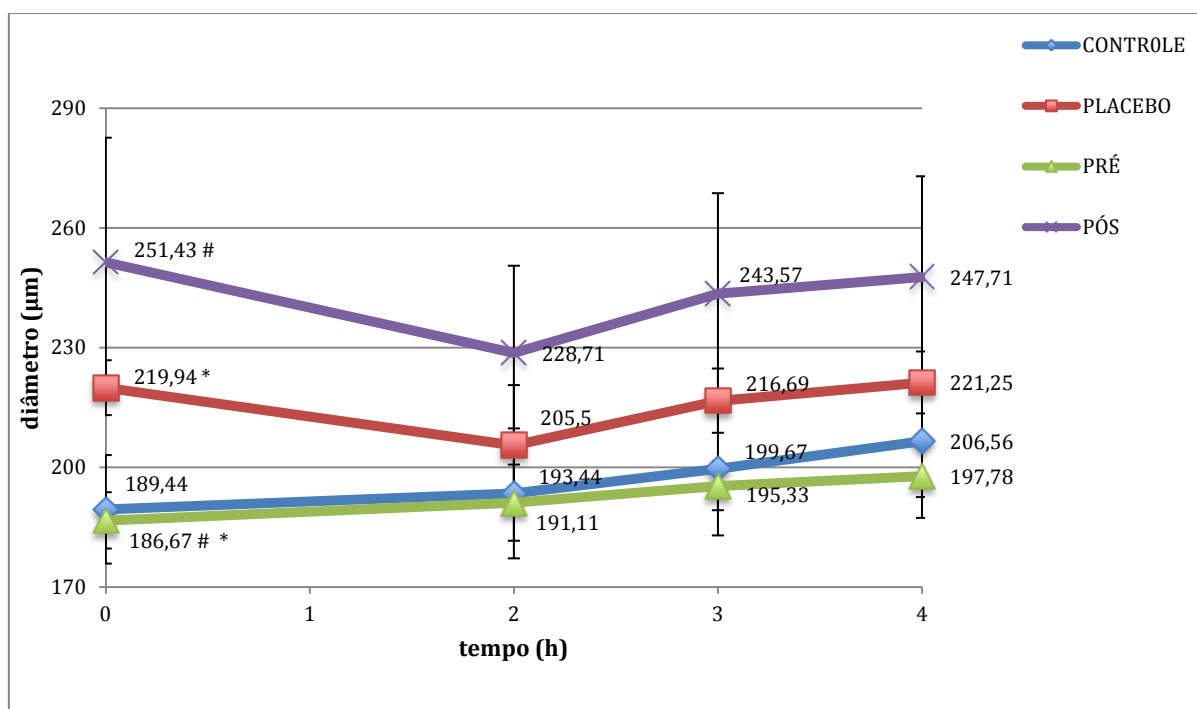


GRÁFICO 1 – DIÂMETRO DA VÊNULA PRINCIPAL (V1) EM CADA GRUPO, EM TODO O PERÍODO DE OBSERVAÇÃO.

Nota: $p \leq 0,05$ para PLACEBO versus PRÉ (*); PRÉ versus PÓS (#)

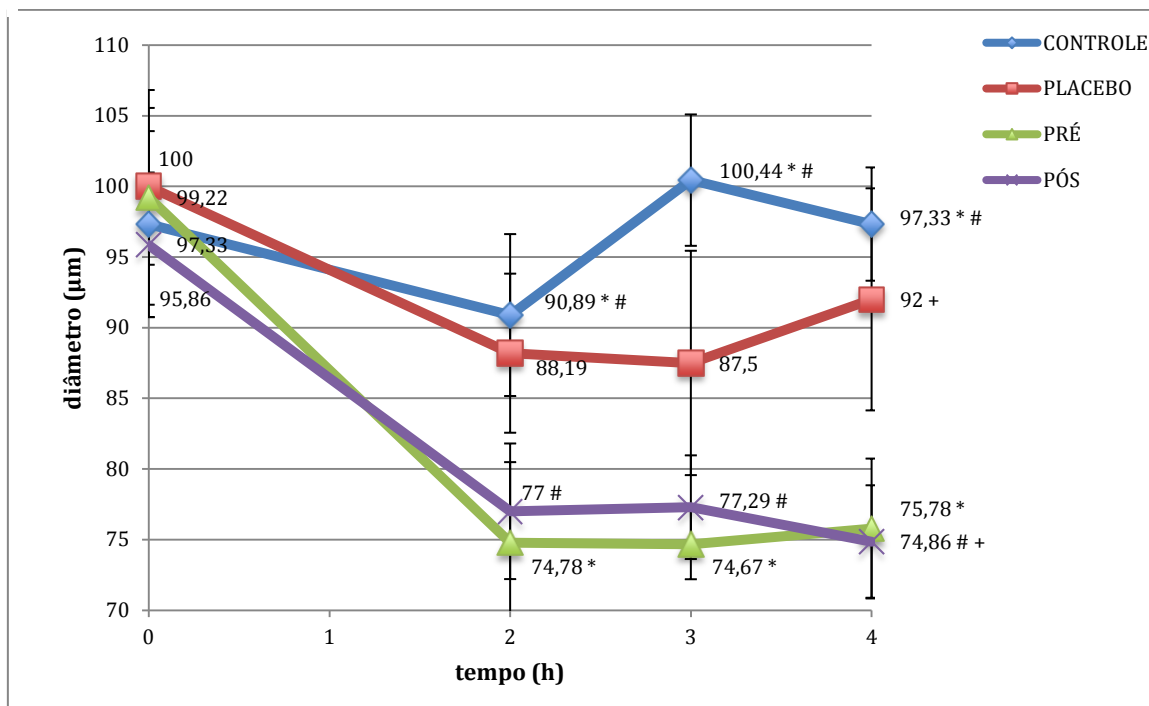


GRÁFICO 2 – DIÂMETRO DA ARTERÍOLA PRINCIPAL (A1) EM CADA GRUPO, EM TODO O PERÍODO DE OBSERVAÇÃO.

Nota: $p \leq 0,05$ para CONTROLE versus PRÉ (*); CONTROLE versus PÓS (#); PLACEBO versus PÓS (+)

O comportamento da arteríola de 1ª ordem (A2-1), entretanto, foi diferente. Observaram-se valores maiores no diâmetro de A2-1 no grupo PÓS quando comparados ao grupo PLACEBO, CONTROLE e também ao grupo PRÉ ($p \leq 0,05$) (GRAFICO 3).

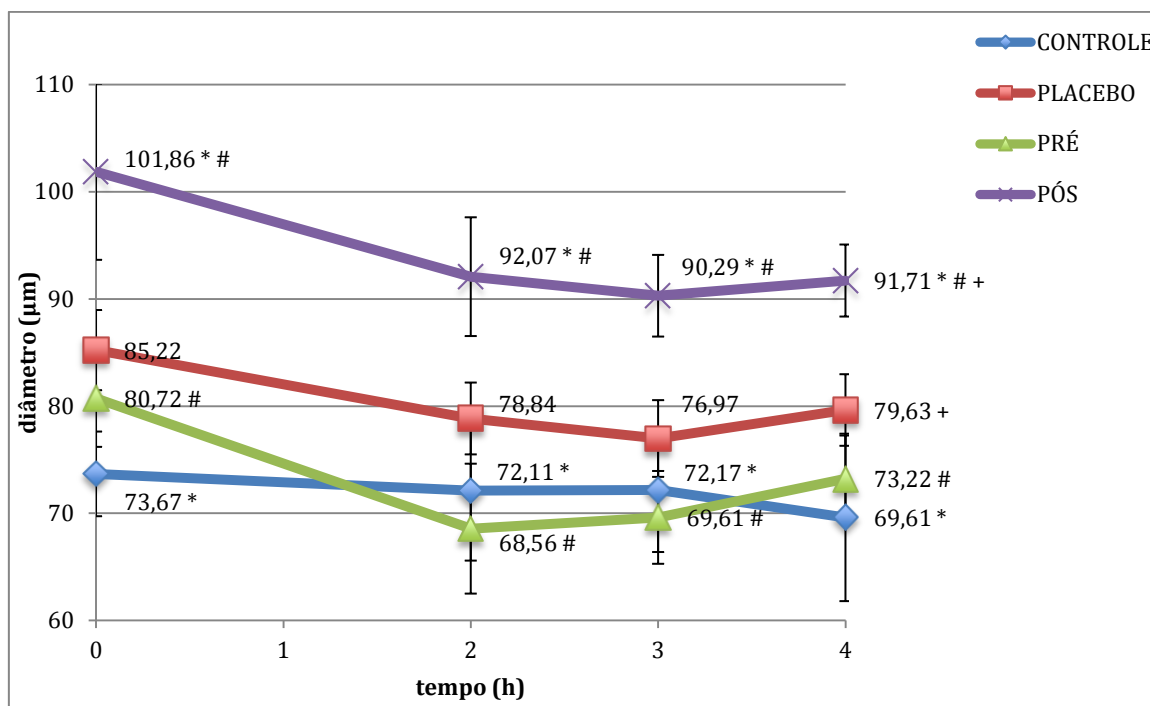


GRÁFICO 3 – DIÂMETRO DA ARTERÍOLA DE 1ª ORDEM (A2-1) EM CADA GRUPO, EM TODO O PERÍODO DE OBSERVAÇÃO.

Nota: $p \leq 0,05$ para CONTROLE versus PÓS (*); PRÉ versus PÓS (#); PÓS versus PLACEBO

Nas arteríolas de 2ª ordem (A2-2), que anatomicamente se encontram em posição mais distal no retalho, foi observado maior diâmetro dos vasos no grupo CONTROLE, que não foi submetido a isquemia, em comparação aos grupo PLACEBO e PÓS (GRAFICO 4).

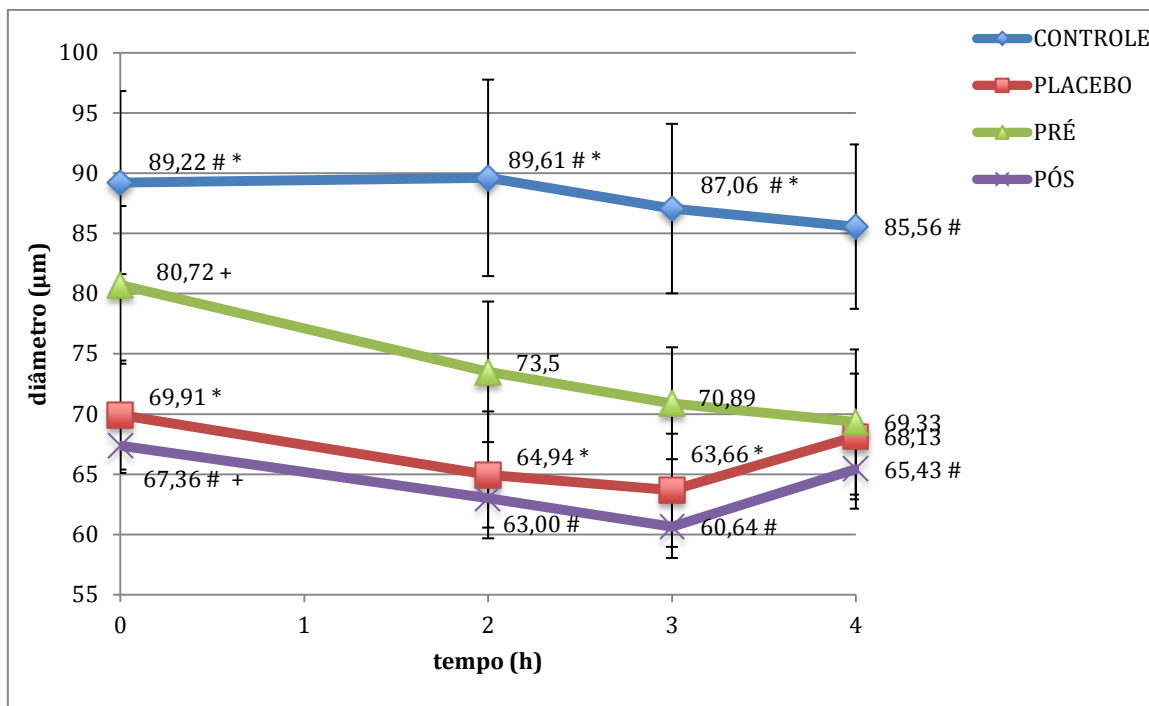


GRÁFICO 4 – DIÂMETRO DA ARTERÍOLA DE 2ª ORDEM (A2-2) EM CADA GRUPO, EM TODO O PERÍODO DE OBSERVAÇÃO.

Nota: $p \leq 0,05$ para CONTROLE versus PÓS (*); CONTROLE versus PLACEBO (#); PÓS versus PRÉ (+)

4.1.2 Índice de Edema

O índice de edema, que reflete a variação na espessura da parede endotelial, evidenciou curvas semelhantes entre os grupos PÓS e CONTROLE, sendo o grupo PÓS estatisticamente superior aos grupos PRÉ e PLACEBO em diferentes momentos (GRAFICO 5).

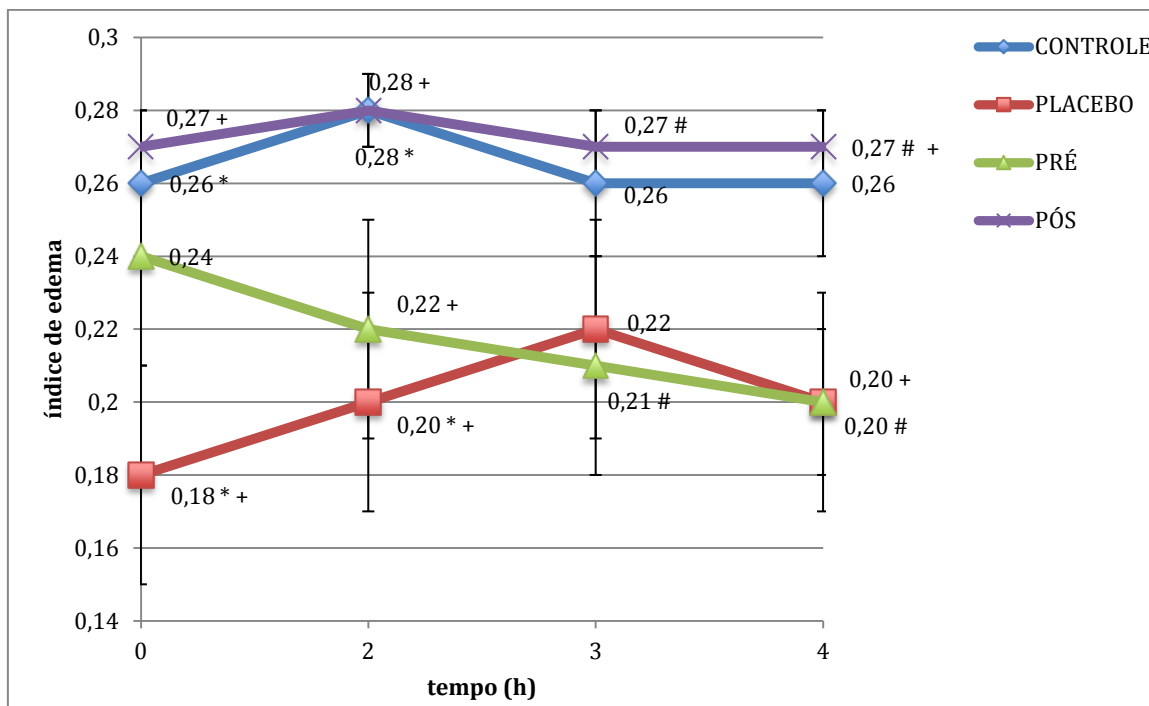


GRÁFICO 5– ÍNDICE DE EDEMA – RAZÃO ENTRE A DIFERENÇA DA MEDIDA DO DIÂMETRO EXTERNO DA VÊNULA PÓS-CAPILAR E O DIÂMETRO INTERNO (DE-DI)/DE . VALORES OBTIDOS DA MÉDIA DOS VALORES PROXIMAL, MÉDIO E DISTAL DO RETALHO.

Nota: $p \leq 0,05$ para CONTROLE versus PLACEBO (*); PRÉ versus PÓS (#); PLACEBO versus PÓS(+)

4.1.3. Velocidade do Fluxo Sanguíneo

Na arteríola de 1ª ordem (A2-1) observaram-se valores superiores do grupo CONTROLE comparado aos grupos PRÉ e PÓS. Os valores do grupo PLACEBO também foram superiores ao grupo PÓS em vários momentos (GRAFICO 6).

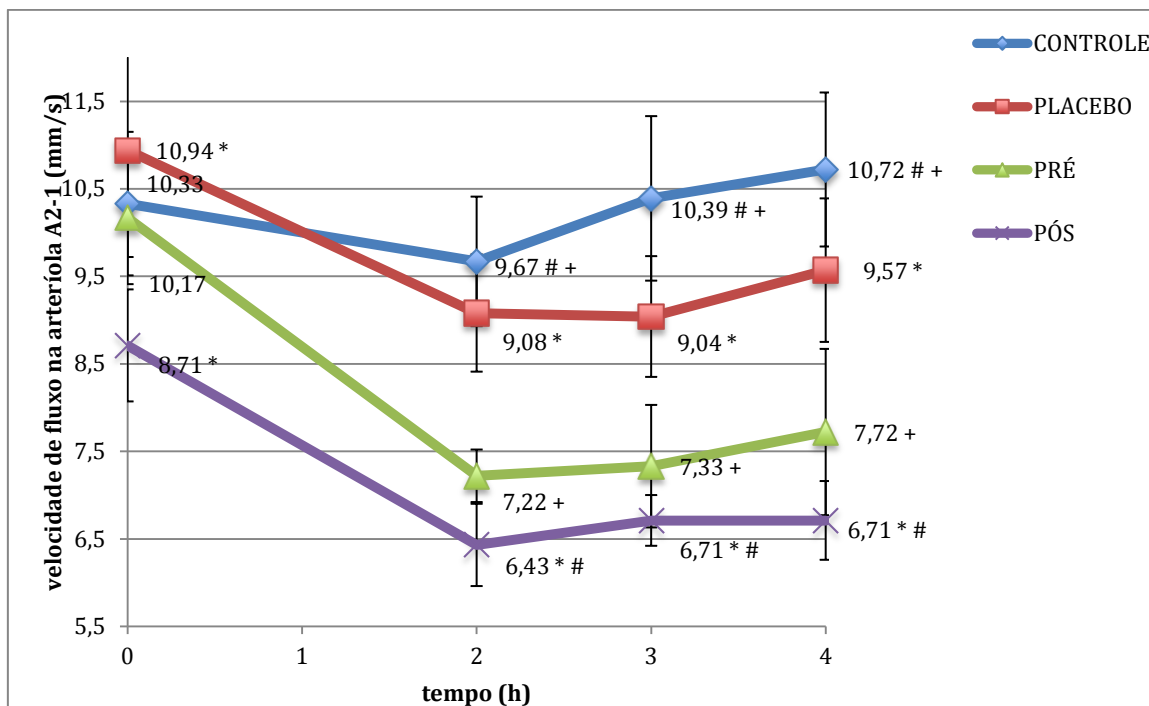


GRÁFICO 6 – VELOCIDADE DO FLUXO SANGUÍNEO (mm/s) DA ARTERÍOLA DE 1ª ORDEM (A2-1)

Nota: $p \leq 0,05$ para PLACEBO versus PÓS (*); controle versus PÓS (#); controle versus PRÉ (+)

4.1.4 Interação leucócito endotelial

A ILE foi avaliada mediante quantificação de leucócitos em rolamento, aderidos e transmigrados.

Para critérios de comparação foi admitido como valor inicial 1 o número de leucócitos em rolamento, aderidos e transmigrados na primeira avaliação. A partir disto as alterações observadas foram proporcionais, relativas e não absolutas.

No GRÁFICO 7 observa-se o comportamento dos leucócitos em rolamento, sendo que a curva dos grupos PRÉ e PÓS mostram redução do número de leucócitos em rolamento, valores menores que no grupo CONTROLE, que não sofreu isquemia.

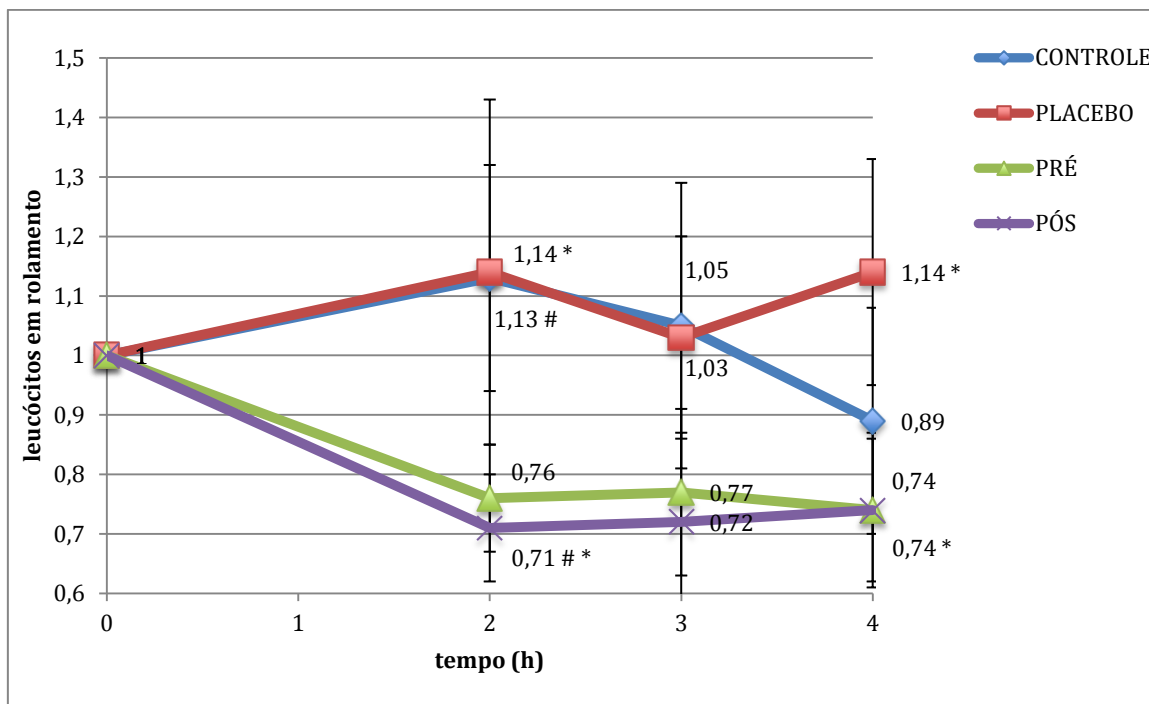


GRÁFICO 7 – LEUCÓCITOS EM ROLAMENTO (RELATIVO). MÉDIA DAS TRÊS ÁREAS DO RETALHO (PROXIMAL, MÉDIA E DISTAL)

Nota: $p \leq 0,05$ para PLACEBO versus PÓS (*); CONTROLE versus PÓS (#)

O comportamento dos leucócitos aderidos, entretanto mostrou diminuição significativa dos leucócitos aderidos no grupo PRÉ, porém o grupo PÓS não mostrou a mesma tendência, tendo valores superiores ao grupo CONTROLE e PLACEBO (GRAFICO 8).

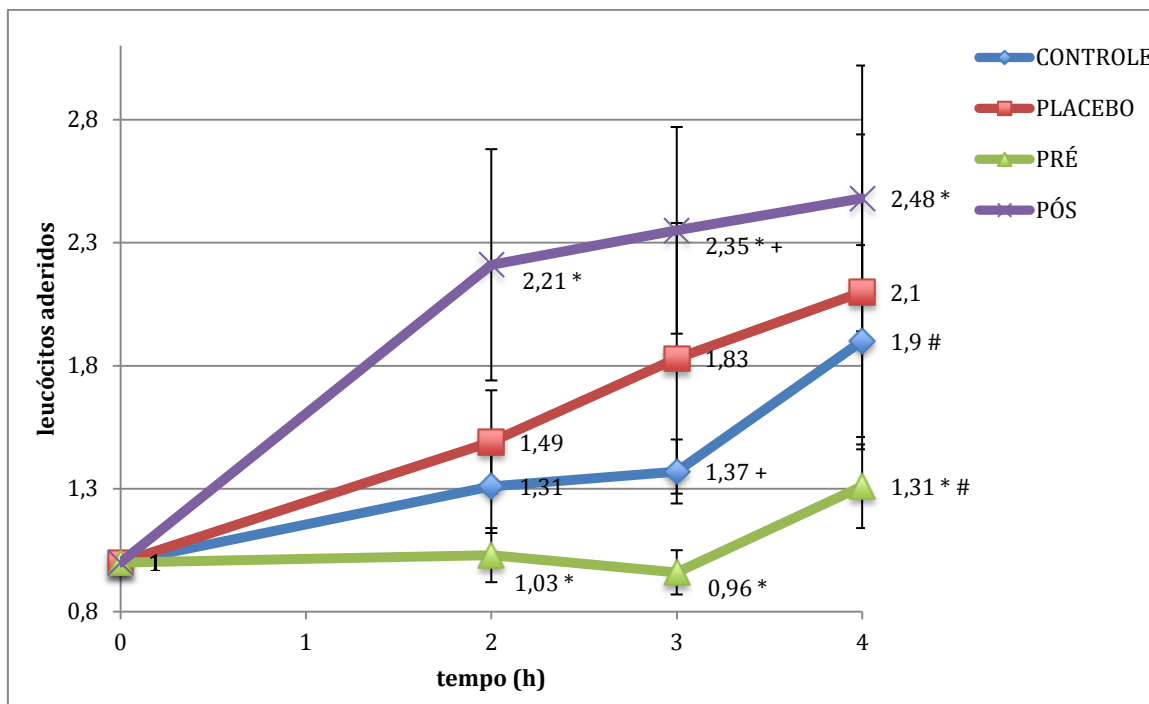


GRÁFICO 8 – LEUCÓCITOS ADERIDOS (RELATIVO). MÉDIA DAS TRÊS ÁREAS DO RETALHO (PROXIMAL, MÉDIA E DISTAL)

Nota: $p \leq 0,05$ para PRÉ versus PÓS (*); CONTROLE versus PRÉ (#); CONTROLE versus PÓS (+)

A avaliação dos leucócitos transmigrados mostrou diminuição dos leucócitos no grupo PÓS, com valores significativamente menores do que os grupos PLACEBO e PRÉ (GRÁFICO 9).

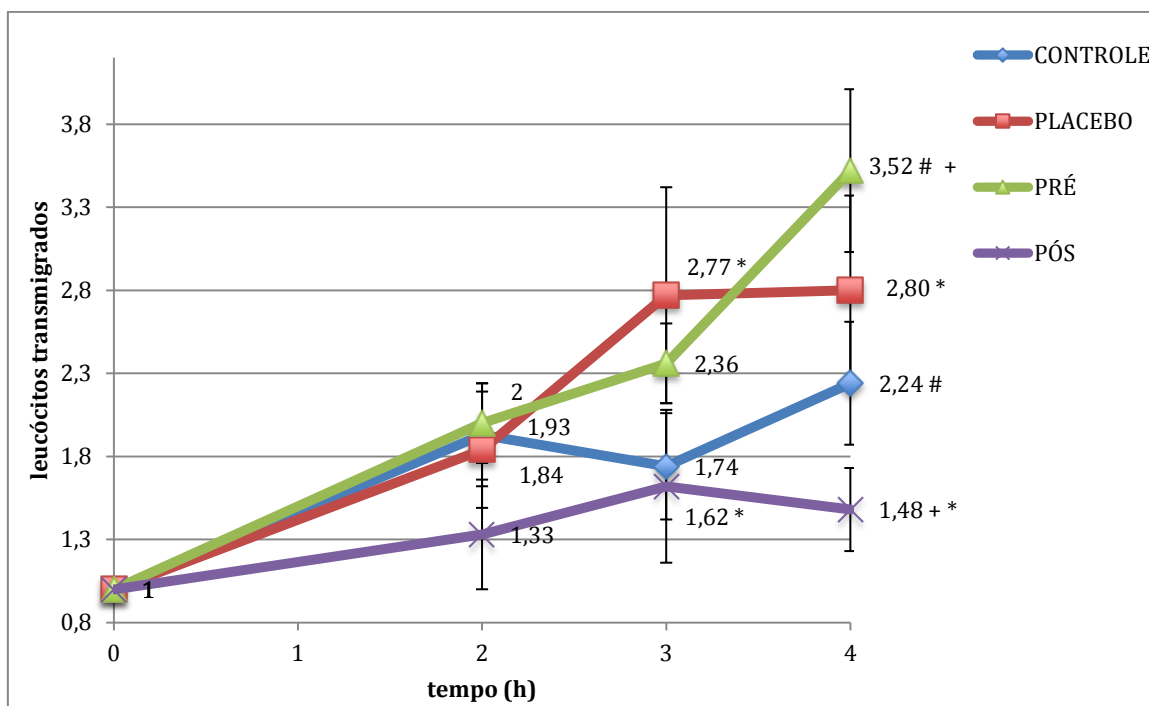


GRÁFICO 9 – LEUCÓCITOS TRANSMIGRADOS (RELATIVO). MÉDIA DAS TRÊS ÁREAS DO RETALHO (PROXIMAL, MÉDIA E DISTAL)

Nota: $p \leq 0,05$ para PLACEBO versus PÓS (*); PRÉ versus PÓS (+); CONTROLE versus PRÉ (#)

4.1.5. Densidade capilar

A análise da quantidade de capilares abertos demonstrou haver diferença entre o grupo controle e os grupos PRÉ e PÓS (dianexina), porém com recuperação dos grupos PRÉ e PÓS na último período de avaliação, não havendo diferença estatística entre os grupos controle, PRÉ e PÓS neste momento (GRÁFICO 10).

Da mesma forma houve melhor desempenho do grupo placebo sobre o grupo PRÉ e PÓS nos períodos intermediários ($p < 0,05$) (GRÁFICO 10).

No último período de avaliação houve similaridade no número de capilares abertos entre todos os grupos (GRÁFICO 10).

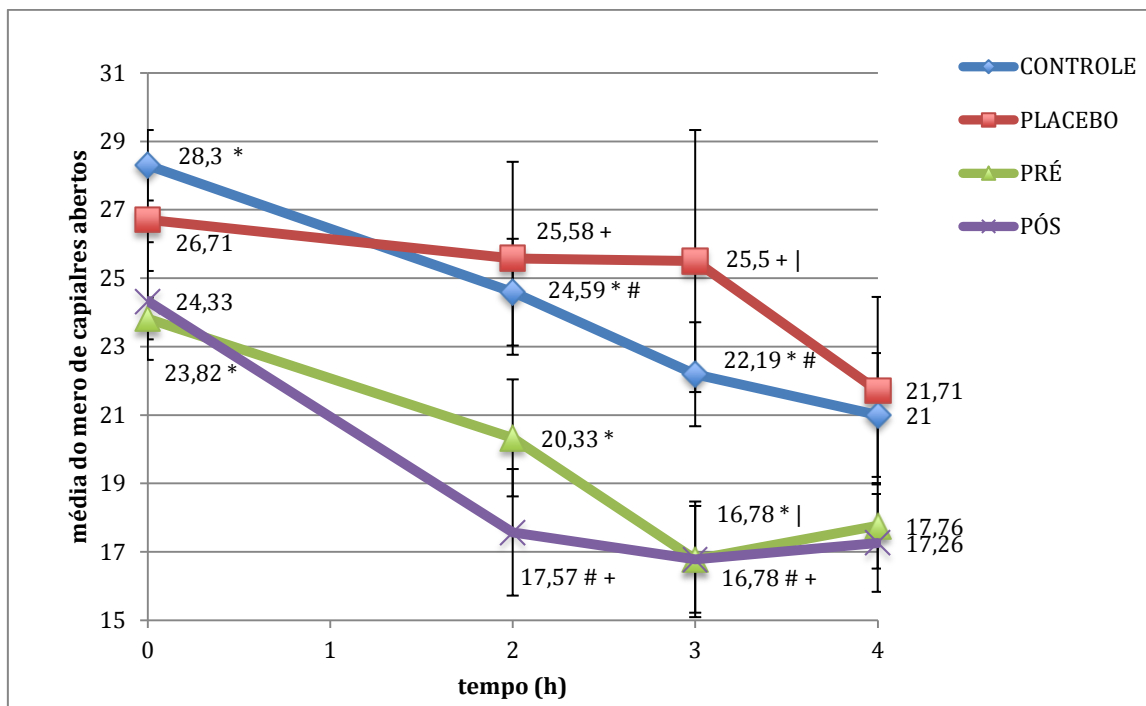


GRÁFICO 10 – DENSIDADE CAPILAR

Nota: $p \leq 0,05$ para CONTROLE versus PRÉ (+); CONTROLE versus PÓS (#); PLACEBO versus PRÉ (|); PRÉ versus CONTROLE (*)

4.2. AVALIAÇÃO DE PERMEABILIDADE

A medida da permeabilidade foi obtida em todos os grupos em diferentes momentos do estudo, mediante o índice de permeabilidade. O grupo PLACEBO apresentou maior índice de permeabilidade do que o grupo PÓS no último momento de avaliação (60 minutos após a injeção de FITC-albumina) (GRÁFICO 11).

Quando foi realizada a comparação entre PLACEBO e os grupos PRÉ e PÓS combinados também foi observado valor superior de permeabilidade no grupo PLACEBO (GRÁFICO 11).

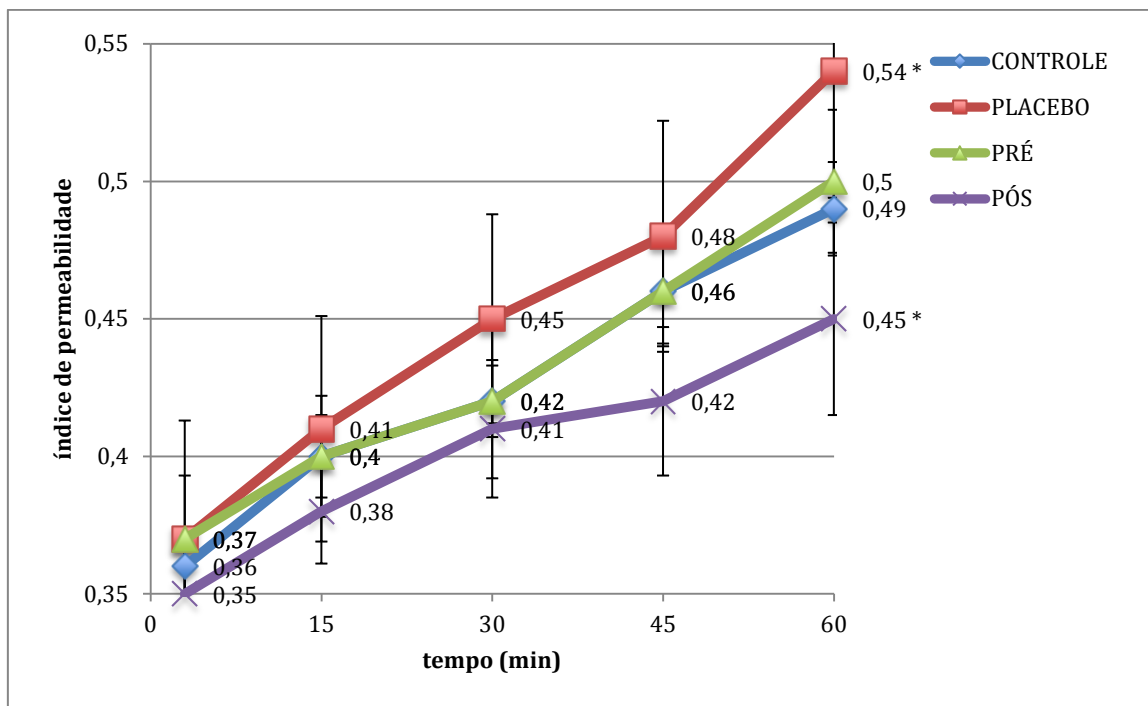


GRÁFICO 11 - ÍNDICE DE PERMEABILIDADE.

Nota: $p \leq 0,05$ para PLACEBO versus PÓS (*)

O grupo com menor permeabilidade, ou seja, com menor lesão endotelial, foi o grupo PÓS, com permeabilidade menor do que o grupo que não foi submetido a isquemia (grupo CONTROLE). O grupo PRÉ teve valores semelhantes ao grupo CONTROLE e inferiores ao grupo PLACEBO, porém apenas na última avaliação foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos PÓS e PLACEBO.

Quando o grupo PLACEBO foi comparado ao grupos PRÉ e PÓS houve menor permeabilidade dos grupos dianexina (PRÉ+PÓS) ($p=0.015$).

	PLACEBO vs CONTROLE	PRÉ vs CONTROLE	PÓS vs CONTROLE	PRÉ vs PLACEBO	PÓS vs PLACEBO	PÓS vs PRÉ
DIÂMETRO VÊNULA	=	=	=	=	=	=
DIÂMETRO ARTERÍOLA PRINCIPAL	=	↓	↓	=	↓	=
DIÂMETRO ARTERÍOLA 1ª ORDEM	=	=	↑	=	↑	↑
DIÂMETRO ARTERÍOLA 2ª ORDEM	=	=	↓	=	=	=
ÍNDICE DE EDEMA	=	=	=	=	↑	↑
VELOCIDADE DE FLUXO SANGUÍNEO	=	↓	↓	=	↓	=
DENSIDADE CAPILAR	=	=	=	=	=	=
INTERAÇÃO LEUCÓCITO ENDOTELIAL						
EM ROLAMENTO	=	=	=	=	↓	=
ADERIDO	=	↓	=	=	=	↑
TRANSMIGRADO	=	↑	=	=	↓	↓
ÍNDICE DE PERMEABILIDADE	=	=	=	=	↓	=

QUADRO 1 – RESUMO DOS RESULTADOS APRESENTADOS. COMPARAÇÕES DOS RESULTADOS OBTIDOS ENTRE OS GRUPOS ÚLTIMO MOMENTO DE AVALIAÇÃO. (↑ VALOR ESTATISTICAMENTE MAIOR ; ↓ VALOR ESTATISTICAMENTE MENOR; = VALOR ESTATISTICAMENTE IGUAL)

5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou os efeitos da dianexina na IR no retalho de músculo cremaster em ratos, mediante a avaliação da microscopia intravital após um período de isquemia de 2 horas. A hipótese do presente estudo é que a translocação da FS para a superfície das células endoteliais durante o período de isquemia é um evento precoce importante na lesão de IR e que o bloqueio da FS pela dianexina poderia diminuir a adesão de leucócitos e plaquetas ao endotélio lesado, levando a diminuição da lesão de IR. Foi observado melhora de alguns parâmetros hemodinâmicos e de permeabilidade nos grupos PRÉ E PÓS quando comparados aos grupos CONTROLE e PLACEBO. O grupo PÓS demonstrou aumento do diâmetro das arteríolas de 1^a. ordem, menor número de leucócitos em rolamento e transmigrados. Além disso, o índice de permeabilidade foi menor no grupo PÓS em relação ao grupo PLACEBO. Estes dados sugerem que existem possíveis efeitos protetores da dianexina contra a lesão de IR quando aplicada após o período de isquemia de duas horas. Por outro lado, o grupo PRÉ também apresentou parâmetros melhores que o grupo CONTROLE, tais como menor número de leucócitos em rolamento e aderidos. Estes resultados mostram que a dianexina pode ter também alguma função se aplicada de forma preventiva, antes do período de isquemia.

5.1 MODELO EXPERIMENTAL

O modelo de retalho de músculo cremaster está bem estabelecido para o estudo da microcirculação em músculos esqueléticos. Foi introduzido por Baez (BAEZ, 1973) e é amplamente usado para a avaliação dos efeitos da IR e dos efeitos na microcirculação de diferentes agentes farmacológicos (YAZICI; SIEMIONOW, 2010), (AYHAN, *et al.*, 2003); (CABRERA; PORVASNIK; DICORLETO; SIEMIONOW; GOLDMAN, 2006); (ERTAS; GOLDMAN; DEITCHER; SIEMIONOW, 2005); (GURUNLUOGLU, *et al.*, 2002); (UNSAL; GURUNLUOGLU; BABUCCU; CARNEVALE; SIEMIONOW, 2002). O modelo do músculo cremaster

permite a avaliação microscópica da microcirculação da musculatura estriada em ratos e por ser um retalho em ilha com apenas uma veia e uma artéria em seu pedículo, é possível a manipulação e interrupção parcial ou total do fluxo sanguíneo para o retalho e até mesmo a cateterização dos vasos do pedículo para amostras de sangue (ALPER; OZEK; COLEN; PREWIT, 1999).

5.2 TEMPO DE ISQUEMIA

A lesão de IR é potencialmente reversível e a musculatura estriada é particularmente sensível à isquemia. Entretanto o momento específico em que a lesão torna-se definitiva e progride para lesão da microcirculação e necrose muscular é objeto de debate.

Foi desenvolvido um experimento em musculatura estriada de ratos em que o músculo era submetido a isquemia de 4 horas e o número de capilares abertos e percentagem de necrose muscular era quantificada progressivamente até 48h após a isquemia (OLIVAS; SAYLOR; WONG; STEPHENSON; ZAMBONI, 2001). Os autores concluíram que nos animais controles os capilares permaneceram abertos durante as primeiras 24 horas do experimento, e no grupo submetido a IR houve uma diminuição significativa no número de capilares abertos durante as primeiras 8 horas de reperfusão. Da mesma forma houve aumento da necrose muscular entre 1 e 7 horas de reperfusão.

Em estudo prévio em cremaster de ratos sobre o efeito da IR em diferentes períodos de isquemia, entre 4 e 6 horas, os autores correlacionaram as mudanças histopatológicas do retalho com o fluxo sanguíneo para o retalho. Observaram que após 6 horas de isquemia o retorno da circulação ao retalho era lenta e após 6 horas de reperfusão não havia mais fluxo sanguíneo no retalho. As alterações histopatológicas com 6 horas de isquemia evidenciaram formação de trombos dentro dos capilares e dilatação das vênulas pós-capilares e edema do endotélio (SIEMIONOW; MANIKOWSKI; GAWRONSKI, 1995).

O uso da dianexina já foi investigado em modelo de 5 horas de isquemia (MOLSKI, *et al.*, 2009), considerado um período de lesão subcrítico, já que acima de 6 horas de isquemia o fluxo sanguíneo já não pode ser restabelecido.

O presente estudo teve por objetivo investigar as alterações promovidas pela IR em um período de 2 horas de isquemia, período mais curto de isquemia, em que o fluxo sanguíneo é restabelecido sem restrições (SIEMIONOW; MANIKOWSKI; GAWRONSKI, 1995), e que é um período de isquemia comum a várias especialidades cirúrgicas (transferências de retalhos microcirúrgicos em cirurgia plástica; revascularizações miocárdicas em cirurgia cardíaca; revascularizações de membros isquêmicos durante by-pass em cirurgia vascular e clampeamentos vasculares em transplantes de órgãos).

Desta forma procuramos avaliar se o benefício encontrado com a dianexina no período de 5 horas de isquemia poderia ser obtido também em um período menor de isquemia.

5.3 PARÂMETROS HEMODINÂMICOS

Os leucócitos são implicados na lesão da microcirculação que ocorre após a reperfusão. Estas células, assim como as plaquetas, aderem ao endotélio das vênulas pós-capilares diminuindo o fluxo sanguíneo. Além disso ocorre vasoconstrição arteriolar, imediatamente após a vasodilatação reativa que ocorre no momento do início da reperfusão (ZAMBONI; ROTH; RUSSELL; GRAHAM; SUCHY; KUCAN, 1993).

IR é uma situação devastadora, para a qual não existe tratamento depois de estabelecida a lesão. Assim sendo a abordagem mais efetiva seria evitar a isquemia. Entretanto sabe-se que isto não é sempre possível, e algumas especialidades cirúrgicas utilizam períodos de isquemia para realizar procedimentos clínicos habituais. Os reimplantes, uma das maiores conquistas da cirurgia nos últimos anos, habitualmente são realizados com períodos de isquemia prolongados e a perda de membros reimplantados se dá principalmente por lesão de IR, e não por problemas técnicos na anastomose. (WANG, 2009)

O conhecimento da fisiopatologia da IR direcionou a pesquisa de opções terapêuticas com alvo nas ILE, ou seja, no momento imediato após a restauração do fluxo sanguíneo. De acordo com a hipótese proposta por este estudo, a dianexina ao se ligar à FS evertida, diminuiria a adesão de leucócitos ao endotélio e, desta forma, restauraria o fluxo sanguíneo na microcirculação.

5.4 OUTRAS DROGAS

Várias substâncias já foram testadas com o objetivo de reduzir as ILE. Os imunossuppressores foram avaliados após período de 4 horas de isquemia no retalho de músculo cremaster do rato e observou melhora do fluxo sanguíneo e diminuição das ILE (ASKAR; BOZKURT, 2002).

O efeito da enoxaparina na microcirculação de músculo cremaster de ratos também foi avaliada, porém sem a presença de IR. Foi observado que os grupos que receberam enoxaparina obtiveram densidade capilar maior (33%) que o grupo controle (ERTAS, *et al.*, 2005). No presente estudo a avaliação da densidade capilar não mostrou superioridade dos grupos PRÉ e PÓS sobre os grupos CONTROLE e PLACEBO.

Em estudo para determinar o efeito a longo prazo da ciclosporina na microcirculação, o modelo do músculo cremaster em ratos foi utilizado para determinar a lesão endotelial mediante micropermeabilidade. FITC albumina foi administrada e os grupos submetidos ao uso de ciclosporina obtiveram maiores índices de permeabilidade quando comparados ao grupo controle (30 minutos - ciclosporina (0.8) x controle (0.5)). O efeito tóxico da ciclosporina foi evidenciado pelo aumento do índice de permeabilidade (UNSAL, *et al.*, 2002)

Outros investigadores testaram a ILE com anticorpos anti CAM-1. O uso de anticorpo anti ICAM-1 mostrou 28 a 80% de redução de lesão de neurônios em modelos animais, entretanto em pesquisas clínicas o uso destes anticorpos elevou a mortalidade e causou efeitos colaterais graves (ENLIMOMAB ACUTE STROKE TRIAL, 2001).

5.5 ESTUDOS COM DIANEXINA

Em um estudo de isquemia em fígado de camundongos, a dianexina foi administrada previamente ao clampeamento do pedículo vascular por 90 minutos. A dianexina (100-1000µg administrada 24h, 1 h ou 5 minutos antes da isquemia) promoveu proteção da lesão celular hepática, com melhora de 80% dos valores da alanina aminotransaminase nos animais que receberam dianexina.

Ainda com relação à isquemia em fígado, foi estudado o uso de dianexina no transplante hepático em ratos (SHEN, *et al.*, 2007). Os fígados de ratos foram preservados a 4 °C, e depois transplantados. Dianexina foi administrada a dose de 200ug/kg aos recipientes no momento da reperusão do fígado e no dia 2. Os enxertos que receberam dianexina apresentaram maior sobrevida, valores menores de alanina aminotransferase, menor lesão histológica do enxerto, menor resposta inflamatória vascular e menor apoptose.

A dianexina também foi estudada no transplante de ilhotas pancreáticas em camundongos, já que o maior problema deste tipo de transplante é a perda de até 60% da massa de ilhotas transplantadas, e a consequente necessidade de múltiplos doadores. Durante o isolamento das ilhotas, ocorre quebra da microcirculação, levando a isquemia das mesmas. O grupo que recebeu dianexina alcançou a normoglicemia em 3,5 dias contra 17 dias do grupo controle (CHENG; SHARMA; CHANG; DING; ALLISON; LEESER; SUTHANTHIRAN; YANG, 2010).

O comportamento do miocárdio foi estudado em coelhos submetidos a oclusão da artéria coronária por 30 minutos seguida de reperusão, tratados ou não com dianexina, e demonstrou menor área de infartos e menor área de não reperusão nos grupos tratados com dianexina (HALE; ALLISON; KLONER, 2010).

Em estudo de isquemia de 5 horas em retalho de músculo estriado, utilizou-se dianexina antes e depois da isquemia e mostrou benefício da droga em ambas as situações. Houve menor permeabilidade nos grupos submetidos a administração de dianexina comparados ao grupo sem isquemia e ao grupo placebo (0,55 x 0,59 x 0,65). A dianexina não mostrou efeito sobre os leucócitos em rolamento, mas mostrou menor adesão dos leucócitos ao endotélio (leucócitos aderidos) principalmente quando a dianexina foi administrada antes da isquemia. Quanto aos leucócitos transmigrados, ao redor da vênula pós-capilar, foi observado maior

transmigração no grupo sem isquemia e menor transmigração tratado com isquemia e solução salina. Os grupos tratados com dianexina apresentaram menor transmigração do que os outros grupos (MOLSKI, *et al.*, 2009).

No presente estudo a dianexina administrada aos grupos PRÉ e PÓS associou-se a menor número de leucócitos em rolamento, inferiores ao grupo CONTROLE não submetido à isquemia. Já em relação aos leucócitos aderidos, a dianexina só mostrou efeito protetor quando administrada previamente à isquemia. A última fase da ILE, a transmigração de leucócitos através do endotélio foi menor apenas no grupo PÓS, que recebeu dianexina após a lesão de IR. Possivelmente houve menor transmigração do grupo PÓS porque houve maior adesão dos leucócitos ao endotélio na fase anterior das ILE. Da mesma forma o grupo PRÉ, que apresentou menor adesão dos leucócitos, na fase seguinte das ILE apresentou maior transmigração dos leucócitos ao redor da vênula pós-capilar.

Com relação à permeabilidade, os resultados reforçaram a hipótese do efeito protetor da dianexina sobre o leito muscular estriado, tendo em vista que o grupo PÓS obteve o menor índice de permeabilidade entre todos os grupos e o grupo PRÉ teve valores semelhantes ao grupo CONTROLE (sem isquemia). O grupo PLACEBO teve o maior grau de lesão endotelial entre os grupos. Apesar de ter havido maior transmigração de leucócitos no grupo PRÉ, não houve maior permeabilidade neste grupo.

A curva da permeabilidade no presente estudo foi semelhante ao estudo de isquemia de 5h em músculo cremaster de ratos (MOLSKI, *et al.*, 2009), porém no modelo de isquemia de 5h a diferença estatística surgiu já na avaliação de 30 minutos, ou seja foi mais precoce. Este achado é compatível com a lesão isquêmica subcrítica do modelo de 5 horas de isquemia.

5.6 PERSPECTIVAS

Dianexina mostra resultados que a colocam como uma potente droga anti-lesão IR e com potencial de se tornar uma nova modalidade no tratamento da lesão de IR. Os possíveis benefícios da utilização da dianexina abrangeriam várias

especialidades médicas, principalmente a cardiologia, transplantes de órgãos e retalhos microcirúrgicos. Atualmente está em andamento um estudo clínico nos EUA, em fase 2, para determinar a segurança da dianexina em receptores de transplantes de rim (KNECHTLE, 2008).

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste estudo pode-se concluir que:

A dianexina apresenta propriedades protetoras da lesão de IR em modelo de IR de 2 horas em musculatura estriada de ratos, especialmente quando administrada após o período de isquemia de 2 horas (grupo PÓS), determinada mediante os seguintes parâmetros:

- aumento no diâmetro das arteríolas de 1^a ordem (A2-1) do grupo PÓS na 2^a, 3^a e 4^a hora de avaliação.
- Menor número de leucócitos em rolamento nos grupos PRÉ e PÓS vs. grupo CONTROLE, e grupo PÓS vs. PLACEBO. Menor número de leucócitos aderidos no grupo PRÉ vs. CONTROLE, PLACEBO e PÓS. Menor número de leucócitos transmigrados no grupo PÓS vs. PRÉ, CONTROLE e PLACEBO.
- o índice de permeabilidade demonstrou superioridade do grupo PÓS sobre o grupo PLACEBO 60 minutos após a administração de FITC albumina.

REFERÊNCIAS

1. AFSHAR-KHARGHAN, V. THIAGARAJAN, P. Leukocyte adhesion and thrombosis. *Curr Opin Hematol*,13, v. 1, p. 34-39 2006.
2. ALBADAWI, H., PATTON, G.M., BRATTON, C.F., PETERSON, B.G. e WATKINS, M.T. Human microvascular endothelial synthesis of interleukin-8 during in vitro ischemia and reperfusion. *J Cell Biochem*,100, v. 2, p. 412-420 2007.
3. ALBANO, E. Seek and hide phosphatidylserine: a new approach to prevent hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology*,133, v. 2, p. 713-716 2007.
4. ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. e WALTER, P. Membrane Structure. In: ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. e WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. Nova Iorque: Garland Science,2007. p. 1392.
5. ALLEN, T.M., WILLIAMSON, P. e SCHLEGEL, R.A. Phosphatidylserine as a determinant of reticuloendothelial recognition of liposome models of the erythrocyte surface. *Proc Natl Acad Sci U S A*,85, v. 21, p. 8067-8071 1988.
6. ALPER, M., OZEK, C., COLEN, L.B. e PREWIT, R. Isolated cremaster flap: A modified model in intravital microscopy. *Microsurgery*,19, v. 8, p. 389-391 1999.
7. AMES, A., 3RD, WRIGHT, R.L., KOWADA, M., THURSTON, J.M. e MAJNO, G. Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *Am J Pathol*,52, v. 2, p. 437-453 1968.
8. ANDERSON, G.L., ACLAND, R.D., SIEMIONOW, M. e MCCABE, S.J. Vascular isolation of the rat cremaster muscle. *Microvasc Res*,36, v. 1, p. 56-63 1988.
9. ARAKI, M., FAHMY, N., ZHOU, L., KUMON, H., KRISHNAMURTHI, V., GOLDFARB, D., MODLIN, C., FLECHNER, S., NOVICK, A.C. e FAIRCHILD, R.L. Expression of IL-8 during reperfusion of renal allografts is dependent on ischemic time. *Transplantation*,81, v. 5, p. 783-788 2006.
10. ASKAR, I. BOZKURT, M. Protective effects of immunosuppressants and steroids against ischemia-reperfusion injury in cremaster muscle flap at microcirculatory level. *Microsurgery*,22, v. 8, p. 361-366 2002.
11. AYHAN, S., TUGAY, C., NORTON, S., ARANEO, B. e SIEMIONOW, M. Dehydroepiandrosterone protects the microcirculation of muscle flaps from ischemia-reperfusion injury by reducing the expression of adhesion molecules. *Plast Reconstr Surg*,111, v. 7, p. 2286-2294 2003.
12. BAEUERLE, P.A. HENKEL, T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol*,12, v., p. 141-179 1994.
13. BAEZ, S. An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. *Microvasc Res*,5, v. 3, p. 384-394 1973.
14. BANBURY, J., SIEMIONOW, M., PORVASNIK, S., PETRAS, S. e BROWNE, E. Improved perfusion after subcritical ischemia in muscle flaps treated with vascular endothelial growth factor. *Plast Reconstr Surg*,106, v. 7, p. 1541-1546 2000.
15. BANBURY, J., SIEMIONOW, M., PORVASNIK, S., PETRAS, S. e ZINS, J.E. Muscle flaps' triphasic microcirculatory response to sympathectomy and denervation. *Plast Reconstr Surg*,104, v. 3, p. 730-737 1999.
16. BECKMAN, J.S., BECKMAN, T.W., CHEN, J., MARSHALL, P.A. e FREEMAN, B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*,87, v. 4, p. 1620-1624 1990.
17. BESSE, S., TANGUY, S., BOUCHER, F., BULTEAU, A.L., RIOU, B., DE LEIRIS, J. e SWYNGHEDAUW, B. Aortic vasoreactivity during prolonged hypoxia and hypoxia-reoxygenation in senescent rats. *Mech Ageing Dev*,123, v. 4, p. 275-285 2002.
18. BILLY, D., SPEIJER, H., ZWAAL, R.F., HACK, E.C. e HERMENS, W.T. Anticoagulant and membrane-degrading effects of secretory (non-pancreatic) phospholipase A2 are inhibited in plasma. *Thromb Haemost*,87, v. 6, p. 978-984 2002.
19. BOERSMA, H.H., KIETSELAER, B.L., STOLK, L.M., BENNAGHMOUCH, A., HOFSTRA, L., NARULA, J., HEIDENDAL, G.A. e REUTELINGSPERGER, C.P. Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. *J Nucl Med*,46, v. 12, p. 2035-2050 2005.
20. BOUTOILLE, D., MARECHAL, X., PICHENOT, M., CHEMANI, C., GUERY, B. e FAURE, K. FITC-albumin as a marker for assessment of endothelial permeability in mice: comparison with 125I-albumin. *Exp Lung Res*,35, v. 4, p. 263-271 2009.

21. CABRERA, G., PORVASNIK, S.L., DICORLETO, P.E., SIEMIONOW, M. e GOLDMAN, C.K. Intra-arterial adenoviral mediated tumor transfection in a novel model of cancer gene therapy. *Mol Cancer*,5, v., p. 32 2006.
- 22.
23. CERRA, F.B., LAJOS, T.Z., MONTES, M. e SIEGEL, J.H. Hemorrhagic infarction: A reperfusion injury following prolonged myocardial ischemic anoxia. *Surgery*,78, v. 1, p. 95-104 1975.
24. CHENG, E.Y., SHARMA, V.K., CHANG, C., DING, R., ALLISON, A.C., LEESER, D.B., SUTHANTHIRAN, M. e YANG, H. Diannexin decreases inflammatory cell infiltration into the islet graft, reduces beta-cell apoptosis, and improves early graft function. *Transplantation*,90, v. 7, p. 709-716 2010.
25. CHINNI, E., TISCIA, G.L., COLAIZZO, D., VERGURA, P., MARGAGLIONE, M. e GRANDONE, E. Annexin V expression in human placenta is influenced by the carriership of the common haplotype M2. *Fertil Steril*,91, v. 3, p. 940-942 2009.
26. CUNHA, M.S., DA SILVA, J.C., NAKAMOTO, H.A. e FERREIRA, M.C. Study of warm ischemia followed by reperfusion on a lower limb model in rats: effect of allopurinol and streptokinase. *Clinics (Sao Paulo)*,60, v. 3, p. 213-220 2005.
27. CUNHA, M.S.B., N.G. Isquemia e Reperusão de Tecidos. *Rev Soc Bras Cir Plást*,22, v. 3, p. 6 2007.
28. DAVANI, E.Y., DORSCHIED, D.R., LEE, C.H., VAN BREEMEN, C. e WALLEY, K.R. Novel regulatory mechanism of cardiomyocyte contractility involving ICAM-1 and the cytoskeleton. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*,287, v. 3, p. H1013-1022 2004.
29. DAVIES, M.G. HAGEN, P.O. The vascular endothelium. A new horizon. *Ann Surg*,218, v. 5, p. 593-609 1993.
30. DE PERROT, M., LIU, M., WADDELL, T.K. e KESHAVJEE, S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*,167, v. 4, p. 490-511 2003.
31. DUNCAN, R., CARPENTER, B., MAIN, L.C., TELFER, C. e MURRAY, G.I. Characterisation and protein expression profiling of annexins in colorectal cancer. *Br J Cancer*,98, v. 2, p. 426-433 2008.
32. ELTZSCHIG, H.K. COLLARD, C.D. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull*,70, v., p. 71-86 2004.
33. ENGLER, R.L., DAHLGREN, M.D., MORRIS, D.D., PETERSON, M.A. e SCHMID-SCHONBEIN, G.W. Role of leukocytes in response to acute myocardial ischemia and reflow in dogs. *Am J Physiol*,251, v. 2 Pt 2, p. H314-323 1986.
34. ENLIMOMAB ACUTE STROKE TRIAL, I. Use of anti-ICAM-1 therapy in ischemic stroke: results of the Enlimomab Acute Stroke Trial. *Neurology*,57, v. 8, p. 1428-1434 2001.
35. EPPINGER, M.J., DEEB, G.M., BOLLING, S.F. e WARD, P.A. Mediators of ischemia-reperfusion injury of rat lung. *Am J Pathol*,150, v. 5, p. 1773-1784 1997.
36. ERTAS, N.M., GOLDMAN, C., DEITCHER, S. e SIEMIONOW, M. Dose response of enoxaparin at the cremaster muscle flap microcirculation. *Microsurgery*,25, v. 2, p. 147-151 2005.
37. FABIANI, J.N., FARAH, B., VUILLEMINOT, A., LECOMPTE, T., EMERIT, I., CHARDIGNY, C. e CARPENTIER, A. Chromosomal aberrations and neutrophil activation induced by reperfusion in the ischaemic human heart. *Eur Heart J*,14 Suppl G, v., p. 12-17 1993.
38. FRANCISCHETTI, I., MORENO, J.B., SCHOLZ, M. e YOSHIDA, W.B. [Leukocytes and the inflammatory response in ischemia-reperfusion injury.]. *Rev Bras Cir Cardiovasc*,25, v. 4, p. 575-584 2010.
39. FRANGOIANNIS, N.G., YOUKER, K.A., ROSSEN, R.D., GWECHENBERGER, M., LINDSEY, M.H., MENDOZA, L.H., MICHAEL, L.H., BALLANTYNE, C.M., SMITH, C.W. e ENTMAN, M.L. Cytokines and the microcirculation in ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*,30, v. 12, p. 2567-2576 1998.
40. FRANKEN, R.J., PETER, F.W., ANDERSON, G.L., WANG, W.Z., WERKER, P.M., SCHUSCHKE, D.A., KON, M. e BARKER, J.H. Anatomy of the feeding blood vessels of the cremaster muscle in the rat. *Microsurgery*,17, v. 7, p. 402-408 1996.
41. FRIEDMAN, H.I., FITZMAURICE, M., LEFAIVRE, J.F., VECCHIOLLA, T. e CLARKE, D. An evidence-based appraisal of the use of hyperbaric oxygen on flaps and grafts. *Plast Reconstr Surg*,117, v. 7 Suppl, p. 175S-190S; discussion 191S-192S 2006.
42. GANONG, W.F. Ganong's review of medical physiology. In: GANONG, W.F. **Ganong's review of medical physiology**. Nova Iorque: McGraw-Hill Medical,2010.
43. GAVIN, J. HAUNSO, S. Introduction to the Focused Issue: The Microcirculation as a Foundation of Cardiovascular Disease. *J Mol Cell Cardiol*,30, v. 12, p. 2529-2530 1998.

44. GERKE, V., CREUTZ, C.E. e MOSS, S.E. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*,6, v. 6, p. 449-461 2005.
45. GERKE, V. MOSS, S.E. Annexins: from structure to function. *Physiol Rev*,82, v. 2, p. 331-371 2002.
46. GIRN, H.R., AHILATHIRUNAYAGAM, S., MAVOR, A.I. e HOMER-VANNIASINKAM, S. Reperfusion syndrome: cellular mechanisms of microvascular dysfunction and potential therapeutic strategies. *Vasc Endovascular Surg*,41, v. 4, p. 277-293 2007.
47. GOTTLIEB, R.A., BURLESON, K.O., KLONER, R.A., BABIOR, B.M. e ENGLER, R.L. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest*,94, v. 4, p. 1621-1628 1994.
48. GOURDIN, M.J., BREE, B. e DE KOCK, M. The impact of ischaemia-reperfusion on the blood vessel. *Eur J Anaesthesiol*,26, v. 7, p. 537-547 2009.
49. GRANGER, D.N. Ischemia-reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. *Microcirculation*,6, v. 3, p. 167-178 1999.
50. GRANT, R.T. Direct Observation of Skeletal Muscle Blood Vessels (Rat Cremaster). *J Physiol*,172, v., p. 123-137 1964.
51. GUDEMEZ, E., TUREGUN, M., ZINS, J. e SIEMIONOW, M. Microvascular permeability following composite tissue transplantation. *Ann Plast Surg*,41, v. 5, p. 519-529 1998.
52. GURUNLUOGLU, R., LUBIATOWSKI, P., GOLDMAN, C.K., CARNEVALE, K. e SIEMIONOW, M. Enhancement of muscle flap hemodynamics by angiopoietin-1. *Ann Plast Surg*,48, v. 4, p. 401-409 2002.
53. HAJJAR, K.A., GUEVARA, C.A., LEV, E., DOWLING, K. e CHACKO, J. Interaction of the fibrinolytic receptor, annexin II, with the endothelial cell surface. Essential role of endonexin repeat 2. *J Biol Chem*,271, v. 35, p. 21652-21659 1996.
54. HALE, S.L., ALLISON, A.C. e KLONER, R.A. Diannexin Reduces No-Reflow after Reperfusion in Rabbits with Large Ischemic Myocardial Risk Zones. *Cardiovasc Ther*, v. 2010.
55. HALESTRAP, A.P. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochem Soc Trans*,34, v. Pt 2, p. 232-237 2006.
56. HALESTRAP, A.P. Mitochondria and reperfusion injury of the heart--a holey death but not beyond salvation. *J Bioenerg Biomembr*,41, v. 2, p. 113-121 2009.
57. HALESTRAP, A.P., MCSTAY, G.P. e CLARKE, S.J. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie*,84, v. 2-3, p. 153-166 2002.
58. HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem*,59, v. 5, p. 1609-1623 1992.
59. HALLIWELL, B., CLEMENT, M.V. e LONG, L.H. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett*,486, v. 1, p. 10-13 2000.
60. HAMMILL, A.K., UHR, J.W. e SCHEUERMANN, R.H. Annexin V staining due to loss of membrane asymmetry can be reversible and precede commitment to apoptotic death. *Exp Cell Res*,251, v. 1, p. 16-21 1999.
61. HAMON, Y., BROCCARDO, C., CHAMBENOIT, O., LUCIANI, M.F., TOTI, F., CHASLIN, S., FREYSSINET, J.M., DEVAUX, P.F., MCNEISH, J., MARGUET, D. e CHIMINI, G. ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nat Cell Biol*,2, v. 7, p. 399-406 2000.
62. HARRIS, A.G., SINITSINA, I. e MESSMER, K. Intravital fluorescence microscopy and phototoxicity: effects on leukocytes. *Eur J Med Res*,7, v. 3, p. 117-124 2002.
63. HARRIS, E.N. PIERANGELI, S.S. Functional effects of anticardiolipin antibodies. *Lupus*,5, v. 5, p. 372-377 1996.
64. HAYES, M.J. MOSS, S.E. Annexins and disease. *Biochem Biophys Res Commun*,322, v. 4, p. 1166-1170 2004.
65. HEEMSKERK, J.W., BEVERS, E.M. e LINDHOUT, T. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost*,88, v. 2, p. 186-193 2002.
66. HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*,407, v. 6805, p. 770-776 2000.
67. HUA, H.T., AL-BADAWI, H., ENTABI, F., STONER, M.C., DIAMOND, R.E., BONHEUR, J.A., HOUSER, S. e WATKINS, M.T. CXC chemokine expression and synthesis in skeletal muscle during ischemia/reperfusion. *J Vasc Surg*,42, v. 2, p. 337-343 2005.
68. ISODA, K., SHIIGAI, M., ISHIGAMI, N., MATSUKI, T., HORAI, R., NISHIKAWA, K., KUSUHARA, M., NISHIDA, Y., IWAKURA, Y. e OHSUZU, F. Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist promotes neointimal formation after injury. *Circulation*,108, v. 5, p. 516-518 2003.
69. JAESCHKE, H. LEMASTERS, J.J. Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology*,125, v. 4, p. 1246-1257 2003.

70. KHALIL, A.A., AZIZ, F.A. e HALL, J.C. Reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg*, 117, v. 3, p. 1024-1033 2006.
71. KIETZMANN, T. GORLACH, A. Reactive oxygen species in the control of hypoxia-inducible factor-mediated gene expression. *Semin Cell Dev Biol*, 16, v. 4-5, p. 474-486 2005.
72. KIM, J.S., HE, L. e LEMASTERS, J.J. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 304, v. 3, p. 463-470 2003.
73. Phase 2 Study of the Safety of Diannexin in Kidney Transplant Recipients. Disponível em: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00615966>. Acesso em: 05/03/2011.
74. KOPAL, C., DEVECI, M., OZTURK, S. e SENGEZER, M. Effects of topical glutathione treatment in rat ischemic wound model. *Ann Plast Surg*, 58, v. 4, p. 449-455 2007.
75. KORTHUIS, R.J., GRANGER, D.N., TOWNSLEY, M.I. e TAYLOR, A.E. The role of oxygen-derived free radicals in ischemia-induced increases in canine skeletal muscle vascular permeability. *Circ Res*, 57, v. 4, p. 599-609 1985.
76. KRAPOHL, B.D., SIEMIONOW, M., PIZA, P., PIERAMICI, S.F. e ZINS, J.E. Thrombogenic stimulus causes long-term decrease of muscle flap perfusion. *Ann Plast Surg*, 42, v. 3, p. 299-305 1999.
77. KRAPOHL, B.D., ZINS, J.E. e SIEMIONOW, M. [A model for allogenic extremity transplantation in the rat with possible microcirculatory monitoring]. *Handchir Mikrochir Plast Chir*, 32, v. 6, p. 430-435 2000.
78. KVIETYS, P.R. SANDIG, M. Neutrophil diapedesis: paracellular or transcellular? *News Physiol Sci*, 16, v., p. 15-19 2001.
79. LANGER, S., GOERTZ, O., STEINSTRASSER, L., KUHNEN, C., STEINAU, H.U. e HOMANN, H.H. New model for in vivo investigation after microvascular breakdown in burns: use of intravital fluorescent microscopy. *Burns*, 31, v. 2, p. 168-174 2005.
80. LEE, Y.H., WEI, F.C., LEE, J. e SU, M.S. Microcirculatory changes following reperfusion insult in diabetic rat skeletal muscles. *Microsurgery*, 20, v. 2, p. 77-84 2000.
81. LEFER, A.M. MA, X.L. Cytokines and growth factors in endothelial dysfunction. *Crit Care Med*, 21, v. 2 Suppl, p. S9-14 1993.
82. LEIST, M. JAATTELA, M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, v. 8, p. 589-598 2001.
83. LI, C. JACKSON, R.M. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol*, 282, v. 2, p. C227-241 2002.
84. LOGUE, S.E., GUSTAFSSON, A.B., SAMALI, A. e GOTTLIEB, R.A. Ischemia/reperfusion injury at the intersection with cell death. *J Mol Cell Cardiol*, 38, v. 1, p. 21-33 2005.
85. LOHMAN, R., YOWELL, R., BARTON, S., ARANEO, B. e SIEMIONOW, M. Dehydroepiandrosterone protects muscle flap microcirculatory hemodynamics from ischemia/reperfusion injury: an experimental in vivo study. *J Trauma*, 42, v. 1, p. 74-80 1997.
86. MAJNO, G. PALADE, G.E. Studies on inflammation. 1. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study. *J Biophys Biochem Cytol*, 11, v., p. 571-605 1961.
87. MAY, J.W., JR., CHAIT, L.A., O'BRIEN, B.M. e HURLEY, J.V. The no-reflow phenomenon in experimental free flaps. *Plast Reconstr Surg*, 61, v. 2, p. 256-267 1978.
88. MOLSKI, M., GROTH, A., ALLISON, A.C., HENDRICKSON, M. e SIEMIONOW, M. Diannexin Treatment Decreases Ischemia-Reperfusion Injury at the Endothelial Cell Level of the Microvascular Bed in Muscle Flaps. *Ann Plast Surg*, v. 2009.
89. MUNZEL, T., AFANAS'EV, I.B., KLESCHYOV, A.L. e HARRISON, D.G. Detection of superoxide in vascular tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22, v. 11, p. 1761-1768 2002.
90. NANHEKHAN, L.V. SIEMIONOW, M. Microcirculatory hemodynamics of the rat cremaster muscle flap in reduced blood flow states. *Ann Plast Surg*, 51, v. 2, p. 182-188 2003.
91. NIESSEN, H.W., LAGRANDE, W.K., VISSER, C.A., MEIJER, C.J. e HACK, C.E. Upregulation of ICAM-1 on cardiomyocytes in jeopardized human myocardium during infarction. *Cardiovasc Res*, 41, v. 3, p. 603-610 1999.
92. OLIVAS, T.P., SAYLOR, T.F., WONG, H.P., STEPHENSON, L.L. e ZAMBONI, W.A. Timing of microcirculatory injury from ischemia reperfusion. *Plast Reconstr Surg*, 107, v. 3, p. 785-788 2001.
93. OZER, K., ADANALI, G., ZINS, J. e SIEMIONOW, M. In vivo microscopic assessment of cremasteric microcirculation during hindlimb allograft rejection in rats. *Plast Reconstr Surg*, 103, v. 7, p. 1949-1956 1999.
94. OZER, K., ZIELINSKI, M. e SIEMIONOW, M. New composite tissue allograft transplantation model in mouse with intravital microscopic evaluation of microcirculation. *J Reconstr Microsurg*, 19, v. 5, p. 323-330 2003.

95. OZER, K., ZIELINSKI, M., UNSAL, M. e SIEMIONOW, M. Development of mouse cremaster transplantation model for intravital microscopic evaluation. *Microcirculation*,9, v. 6, p. 487-495 2002.
96. POBER, J.S., LAPIERRE, L.A., STOLPEN, A.H., BROCK, T.A., SPRINGER, T.A., FIER, W., BEVILACQUA, M.P., MENDRICK, D.L. e GIMBRONE, M.A., JR. Activation of cultured human endothelial cells by recombinant lymphotoxin: comparison with tumor necrosis factor and interleukin 1 species. *J Immunol*,138, v. 10, p. 3319-3324 1987.
97. QUILLEN, J.E., SELLKE, F.W., BROOKS, L.A. e HARRISON, D.G. Ischemia-reperfusion impairs endothelium-dependent relaxation of coronary microvessels but does not affect large arteries. *Circulation*,82, v. 2, p. 586-594 1990.
98. RAN, S., DOWNES, A. e THORPE, P.E. Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels. *Cancer Res*,62, v. 21, p. 6132-6140 2002.
99. REUTELINGSPERGER, C.P. Annexins: key regulators of haemostasis, thrombosis, and apoptosis. *Thromb Haemost*,86, v. 1, p. 413-419 2001.
100. RUDIGER, H.A., GRAF, R. e CLAVIEN, P.A. Liver ischemia: apoptosis as a central mechanism of injury. *J Invest Surg*,16, v. 3, p. 149-159 2003.
101. SALVEMINI, D. CUZZOCREA, S. Superoxide, superoxide dismutase and ischemic injury. *Curr Opin Investig Drugs*,3, v. 6, p. 886-895 2002.
102. SATO, N., GOTO, T., HARANAKA, K., SATOMI, N., NARIUCHI, H., MANO-HIRANO, Y. e SAWASAKI, Y. Actions of tumor necrosis factor on cultured vascular endothelial cells: morphologic modulation, growth inhibition, and cytotoxicity. *J Natl Cancer Inst*,76, v. 6, p. 1113-1121 1986.
103. SCHUTTERS, K. REUTELINGSPERGER, C. Phosphatidylserine targeting for diagnosis and treatment of human diseases. *Apoptosis*,15, v. 9, p. 1072-1082 2010.
104. SCOTT ISENBERG, J. Modulating effects of L-arginine on cytokine-stimulated lymphocyte migration in vitro. *Microsurgery*,23, v. 3, p. 262-267 2003.
105. SERRACINO-INGLOTT, F., HABIB, N.A. e MATHIE, R.T. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg*,181, v. 2, p. 160-166 2001.
106. SHEN, X.D., KE, B., ZHAI, Y., TSUCHIHASHI, S.I., GAO, F., DUARTE, S., COITO, A., BUSUTTIL, R.W., ALLISON, A.C. e KUPIEC-WEGLINSKI, J.W. Diannexin, a novel annexin V homodimer, protects rat liver transplants against cold ischemia-reperfusion injury. *Am J Transplant*,7, v. 11, p. 2463-2471 2007.
107. SIEMIONOW, M. ARSLAN, E. Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery*,24, v. 6, p. 468-475 2004.
108. SIEMIONOW, M., DEMIRKAN, F., ROCKWELL, W.B. e LISTER, G.D. Anti-ICAM-1 antibodies protect allografts against microvascular and parenchymal cell damage. *J Hand Surg [Am]*,22, v. 5, p. 922-930 1997.
109. SIEMIONOW, M., MANIKOWSKI, W. e GAWRONSKI, M. Histopathology of muscle flap microcirculation following prolonged ischemia. *Microsurgery*,16, v. 8, p. 515-521 1995.
110. SIEMIONOW, M. MOREIRA-GONZALEZ, A. The Cremaster Muscle as a Microvascular Research Model. In: SIEMIONOW, M. MOREIRA-GONZALEZ, A. **Microvascular Research: Biology and Pathology**. San Diego: Elsevier Science,2005. p. 1296.
111. SIEMIONOW, M. NANHEKHAN, L.V. Introduction of cremaster muscle chamber technique for long-term intravital microscopy. *Ann Plast Surg*,43, v. 2, p. 161-166 1999.
112. SIEMIONOW, M., OZER, K., PORVASNIK, S. e ZINS, J. Microcirculatory window for early detection of allograft rejection. *Ann Plast Surg*,44, v. 6, p. 637-643 2000.
113. SIEMIONOW, M., ROMANOWSKI, L. e LISTER, G. Leukocyte-depleting effect of hypothermia on muscle flap microcirculation following ischemia-reperfusion injury. *J Hand Surg [Am]*,18, v. 6, p. 963-971 1993.
114. SPRINGER, T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*,76, v. 2, p. 301-314 1994.
115. TAPURIA, N., KUMAR, Y., HABIB, M.M., ABU AMARA, M., SEIFALIAN, A.M. e DAVIDSON, B.R. Remote ischemic preconditioning: a novel protective method from ischemia reperfusion injury--a review. *J Surg Res*,150, v. 2, p. 304-330 2008.
116. TEDDER, T.F., STEEBER, D.A., CHEN, A. e ENGEL, P. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J*,9, v. 10, p. 866-873 1995.
117. TEOH, N.C., ITO, Y., FIELD, J., BETHEA, N.W., AMR, D., MCCUSKEY, M.K., MCCUSKEY, R.S., FARRELL, G.C. e ALLISON, A.C. Diannexin, a novel annexin V homodimer, provides prolonged protection against hepatic ischemia-reperfusion injury in mice. *Gastroenterology*,133, v. 2, p. 632-646 2007.
118. THIAGARAJAN, R.R., WINN, R.K. e HARLAN, J.M. The role of leukocyte and endothelial adhesion molecules in ischemia-reperfusion injury. *Thromb Haemost*,78, v. 1, p. 310-314 1997.

119. TIEFENBACHER, C.P., CHILIAN, W.M., MITCHELL, M. e DEFILY, D.V. Restoration of endothelium-dependent vasodilation after reperfusion injury by tetrahydrobiopterin. *Circulation*,94, v. 6, p. 1423-1429 1996.
120. TUREGUN, M., GUDEMEZ, E., NEWMAN, P., ZINS, J. e SIEMIONOW, M. Blockade of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) protects against ischemia-reperfusion injury in muscle flaps at microcirculatory level. *Plast Reconstr Surg*,104, v. 4, p. 1033-1040 1999.
121. TURER, A.T. HILL, J.A. Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and rationale for therapy. *Am J Cardiol*,106, v. 3, p. 360-368 2010.
122. TYLER, D.D. Polarographic assay and intracellular distribution of superoxide dismutase in rat liver. *Biochem J*,147, v. 3, p. 493-504 1975.
123. UNSAL, M., GURUNLUOGLU, R., BABUCCU, O., CARNEVALE, K. e SIEMIONOW, M. Effect of long-term cyclosporine administration on muscle flap hemodynamics. *Ann Plast Surg*,48, v. 3, p. 305-311 2002.
124. VAJDOVA, K., GRAF, R. e CLAVIEN, P.A. ATP-supplies in the cold-preserved liver: A long-neglected factor of organ viability. *Hepatology*,36, v. 6, p. 1543-1552 2002.
125. VAN WETERING, S., VAN DEN BERK, N., VAN BUUL, J.D., MUL, F.P., LOMMERSE, I., MOUS, R., TEN KLOOSTER, J.P., ZWAGINGA, J.J. e HORDIJK, P.L. VCAM-1-mediated Rac signaling controls endothelial cell-cell contacts and leukocyte transmigration. *Am J Physiol Cell Physiol*,285, v. 2, p. C343-352 2003.
126. VOGEL, S.M., EASINGTON, C.R., MINSHALL, R.D., NILES, W.D., TIRUPPATHI, C., HOLLENBERG, S.M., PARRILLO, J.E. e MALIK, A.B. Evidence of transcellular permeability pathway in microvessels. *Microvasc Res*,61, v. 1, p. 87-101 2001.
127. WANG, P. ZWEIER, J.L. Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart. Evidence for peroxynitrite-mediated reperfusion injury. *J Biol Chem*,271, v. 46, p. 29223-29230 1996.
128. WANG, W.Z. Investigation of reperfusion injury and ischemic preconditioning in microsurgery. *Microsurgery*,29, v. 1, p. 72-79 2009.
129. WANG, W.Z., ANDERSON, G., FLEMING, J.T., PETER, F.W., FRANKEN, R.J., ACLAND, R.D. e BARKER, J. Lack of nitric oxide contributes to vasospasm during ischemia/reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg*,99, v. 4, p. 1099-1108 1997.
130. WANG, W.Z., FANG, X.H., STEPHESON, L.L., KHIABANI, K.T. e ZAMBONI, W.A. Acute microvascular action of vascular endothelial growth factor in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg*,115, v. 5, p. 1355-1365 2005.
131. WEIS, S.M. Vascular permeability in cardiovascular disease and cancer. *Curr Opin Hematol*,15, v. 3, p. 243-249 2008.
132. WEYRICH, A.S., MA, X.L. e LEFER, A.M. The role of L-arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat. *Circulation*,86, v. 1, p. 279-288 1992.
133. YANG, L., FROIO, R.M., SCIUTO, T.E., DVORAK, A.M., ALON, R. e LUSCINSKAS, F.W. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. *Blood*,106, v. 2, p. 584-592 2005.
134. YAZICI, I. SIEMIONOW, M. Lymphatic circulation of the rat cremaster muscle flap. *Microvasc Res*,79, v. 2, p. 91-92 2010.
135. ZAMBONI, W.A., ROTH, A.C., RUSSELL, R.C., GRAHAM, B., SUCHY, H. e KUCAN, J.O. Morphologic analysis of the microcirculation during reperfusion of ischemic skeletal muscle and the effect of hyperbaric oxygen. *Plast Reconstr Surg*,91, v. 6, p. 1110-1123 1993.
136. ZHANG, J. MCCRAE, K.R. Annexin A2 mediates endothelial cell activation by antiphospholipid/anti-beta2 glycoprotein I antibodies. *Blood*,105, v. 5, p. 1964-1969 2005.

APÊNDICE 1

COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA DA DENSIDADE CAPILAR (PROXIMAL, MÉDIA E DISTAL) E DO ÍNDICE DE EDEMA ENTRE OS GRUPOS

Variável	CONTROLE vs PRÉ	CONTROLE vs PÓS	CONTROLE vs PLACEBO	PRÉ vs PÓS	PRÉ vs PLACEBO	PÓS vs PLACEBO	CONTROLE vs DIANEXINA	PLACEBO vs DIANEXINA
Média da Densidade Capilar	0,76	0,41	0,33	0,40	0,33	0,050	0,60	0,043
Densidade Capilar - Proximal	0,99	0,41	0,43	0,37	0,43	0,31	0,75	0,31
Densidade Capilar – Meio	0,93	0,70	0,44	0,57	0,44	0,12	0,90	0,18
Densidade Capilar - Distal	0,10	0,055	0,70	0,013	0,70	0,042	0,12	0,041
Índice de Edema – Média	0,16	0,87	0,25	0,30	0,25	0,51	0,49	0,14
Índice de Edema - Proximal	0,47	0,59	0,95	0,31	0,95	0,35	0,60	0,24
Índice de Edema – Meio	0,81	0,93	0,42	0,79	0,42	0,29	0,94	0,17
Índice de Edema - Distal	0,065	0,57	0,001	0,80	0,001	0,27	0,18	0,037

NOTA: Valores de p para as comparações nos diferentes momentos de avaliação da densidade capilar e do índice de edema são mostradas separadamente pelo local

APÊNDICE 2

COMPARAÇÃO DO DIÂMETRO DA VEIA E ARTÉRIAS E DA VELOCIDADE DE FLUXO NA VEIA E ARTÉRIAS NOS GRUPOS ESTUDADOS

Variável	CONTROLE vs PRÉ	CONTROLE vs PÓS	CONTROLE vs PLACEBO	PRÉ vs PÓS	PRÉ vs PLACEBO	PÓS vs PLACEBO	CONTROLE vs DIANEXINA	PLACEBO vs DIANEXINA
Diâmetro - Veia Principal	0,98	0,30	0,59	0,23	0,59	0,95	0,71	0,97
Diâmetro - A1	0,024	0,070	0,26	0,79	0,26	0,32	0,017	0,15
Diâmetro – A2 e A2-1	0,33	0,61	0,72	0,92	0,72	0,93	0,37	0,79
Diâmetro – A3 e A3-1	0,70	0,64	0,68	0,29	0,68	0,99	0,73	0,82
Velocidade – Veia principal	0,70	0,71	0,92	0,85	0,92	0,92	0,68	0,86
Velocidade- A1	0,29	0,59	0,73	0,39	0,73	0,30	0,45	0,24
Velocidade- A2 e A2-1	0,038	0,13	0,47	0,75	0,47	0,86	0,037	0,75
Velocidade - A3 e A3-1	0,068	0,59	0,41	0,25	0,41	0,88	0,066	0,22

NOTA - Valores p para as comparações de diferentes momentos de avaliação no diâmetro e na velocidade de fluxo são mostradas separadamente por tipo de artéria/veia

APÊNDICE 3

COMPARAÇÃO DAS CONTAGENS DE LEUCÓCITOS ENTRE OS GRUPOS NOS DIFERENTES TEMPÓS DE AVALIAÇÃO MOSTRADOS SEPARADAMENTE PELA LOCALIZAÇÃO

Variável	CONTROLE vs PRÉ	CONTROLE vs PÓS	CONTROLE e vs PLACEBO	PRÉ vs PÓS	PRÉ vs PLACEBO	PÓS vs PLACEBO	CONTROLE vs DIANEXINA	PLACEBO vs DIANEXINA
Leucócitos em Rolamento – Média	0,54	0,12	0,97	0,34	0,97	0,006	0,25	0,016
Leucócitos em Rolamento - Proximal	0,79	0,66	0,70	0,43	0,70	0,69	0,78	0,67
Leucócitos em Rolamento – Meio	0,088	0,005	0,33	0,37	0,33	0,024	0,007	0,043
Leucócitos em Rolamento - Distal	0,67	0,36	0,88	0,024	0,88	0,028	0,59	0,072
Leucócitos Aderidos – Média	0,20	0,43	0,86	0,002	0,86	0,95	0,85	0,62
Leucócitos Aderidos - Proximal	0,27	0,80	0,61	0,030	0,61	0,85	0,75	0,54
Leucócitos Aderidos – Meio	0,28	0,96	0,43	0,28	0,43	0,73	0,73	0,13
Leucócitos Aderidos – Distal	0,62	0,078	0,60	0,024	0,60	0,12	0,34	0,25
Leucócitos Transmigrados – Média	0,39	0,99	0,53	0,019	0,53	0,22	0,88	0,32
Leucócitos Transmigrados - Proximal	0,92	0,90	0,90	0,20	0,90	0,75	0,99	0,73
Leucócitos Transmigrados – Meio	0,093	0,082	0,12	0,16	0,12	0,38	0,075	0,12
Leucócitos Transmigrados - Distal	0,65	0,57	0,064	0,25	0,064	0,14	0,66	0,13

NOTA – Valores p para a comparação nos diferentes períodos de avaliação da contagem de leucócitos são mostrados separadamente pela localização

APÊNDICE 4

COMPARAÇÃO DOS ÍNDICES DE ROLAMENTO, ADESÃO E TRANSMIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS ENTRE OS GRUPOS

Variável	CONTROLE vs PRÉ	CONTROLE vs PÓS	CONTROLE vs PLACEBO	PRÉ vs PÓS	PRÉ vs PLACEBO	PÓS vs PLACEBO	CONTROLE vs DIANEXINA	PLACEBO vs DIANEXINA
Leucócitos em Rolamento - Média	0,35	0,22	0,84	0,66	0,84	0,20	0,25	0,29
Leucócitos em Rolamento - Proximal	0,98	0,58	0,63	0,66	0,63	0,60	0,83	0,58
Leucócitos em Rolamento - Meio	0,066	0,005	0,092	0,16	0,092	0,10	0,018	0,19
Leucócitos em Rolamento - Distal	0,37	0,37	0,50	0,024	0,50	0,15	0,42	0,14
Leucócitos Aderidos - Média	0,39	0,23	0,72	0,024	0,72	0,51	0,66	0,82
Leucócitos Aderidos - Proximal	0,50	0,87	0,39	0,20	0,39	0,38	0,95	0,48
Leucócitos Aderidos - Meio	0,58	0,82	0,33	0,56	0,33	0,78	0,89	0,37
Leucócitos Aderidos - Distal	0,82	0,056	0,59	0,045	0,59	0,065	0,12	0,14
Leucócitos Transmigrados - Média	0,12	0,38	0,21	0,009	0,21	0,28	0,65	0,54
Leucócitos Transmigrados - Proximal	0,46	0,23	0,72	0,063	0,72	0,76	0,39	0,84
Leucócitos Transmigrados - Meio	0,10	0,36	0,084	0,29	0,084	0,51	0,16	0,33
Leucócitos Transmigrados - Distal	0,54	0,57	0,094	0,26	0,094	0,34	0,70	0,33

NOTA – Os valores “p” para comparações das contagens de leucócitos nos diferentes períodos de avaliação são mostrados separadamente por localização

APÊNDICE 5

MÉDIA DOS NÍVEIS DE DENSIDADE CAPILAR APÓS 2 HORAS DE ISQUEMIA NOS GRUPOS, COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS ENTRE OS GRUPOS, COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS QUE USARAM DIANEXINA (PRÉ E PÓS) , GRUPO CONTROLE E GRUPO PLACEBO E COMPARAÇÕES ENTRE OS GRUPOS EM CADA TEMPO ESTUDADO

Variável	Tempo	CONTROLE	PRÉ	PÓS	PLACEBO	PLACEBO vs DIANEXINA	CONTROLE vs PRÉ	CONTROLE vs PÓS	CONTROLE vs PLACEBO	PRÉ vs PÓS	PRÉ vs PLACEBO	PÓS vs PLACEBO
Densidade Capilar – Média	0	28,30 (1,03)	23,81 (0,61)	24,33 (1,72)	26,71 (1,50)	0,043	0,027	0,078	0,60	0,81	0,33	0,44
	2	24,59 (1,56)	20,33 (1,71)	17,57 (1,85)	25,58 (2,82)		0,035	0,002	0,74	0,19	0,077	0,011
	3	22,19 (1,52)	16,78 (1,69)	16,14 (1,56)	25,50 (3,83)		0,008	0,008	0,27	0,76	0,004	0,003
	4	21,00 (1,81)	17,26 (1,25)	17,10 (1,43)	21,71 (2,74)		0,063	0,082	0,81	0,94	0,13	0,14
Densidade Capilar – Proximal	0	33,33 (1,32)	27,33 (0,87)	28,86 (1,55)	29,00 (1,71)	0,31	0,036	0,14	0,24	0,57	0,62	0,97
	2	29,22 (2,18)	23,67 (2,45)	23,86 (2,21)	28,50 (3,21)		0,052	0,080	0,84	0,94	0,15	0,19
	3	26,00 (1,83)	20,11 (2,38)	23,57 (1,93)	27,75 (3,80)		0,040	0,43	0,64	0,19	0,025	0,24
	4	26,22 (3,07)	20,67 (1,12)	26,86 (2,33)	25,38 (3,01)		0,052	0,83	0,82	0,021	0,16	0,68
Densidade Capilar - Meio	0	28,56 (1,64)	23,89 (0,82)	23,57 (1,81)	27,13 (1,47)	0,18	0,074	0,077	0,68	0,90	0,32	0,30
	2	24,78 (2,05)	21,00 (2,29)	17,00 (2,36)	26,38 (2,92)		0,15	0,006	0,64	0,12	0,10	0,007
	3	21,67 (1,96)	17,89 (1,69)	13,43 (1,56)	25,50 (3,98)		0,15	0,004	0,27	0,082	0,022	< 0,001
	4	20,78 (2,30)	18,11 (1,49)	14,29 (1,94)	21,38 (2,91)		0,30	0,022	0,86	0,13	0,32	0,041
Densidade Capilar - Distal	0	23,00 (1,92)	20,22 (1,13)	20,57 (2,29)	24,00 (1,60)	0,041	0,22	0,35	0,77	0,88	0,23	0,32
	2	19,78 (1,68)	16,33 (1,20)	11,86 (1,72)	21,88 (3,31)		0,13	0,003	0,54	0,056	0,082	0,004
	3	18,89 (2,26)	12,33 (1,46)	11,43 (1,95)	23,25 (4,18)		0,005	0,005	0,20	0,70	< 0,001	< 0,001
	4	16,00 (1,47)	13,00 (1,61)	10,14 (1,34)	18,38 (2,71)		0,19	0,027	0,48	0,22	0,092	0,017

APÊNDICE 6

MÉDIA DOS VALORES DO ÍNDICE DE EDEMA APÓS 2 HORAS DE ISQUEMIA, COMPARAÇÕES ENTRE OS GRUPOS, COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS DIANEXINA (PRÉ E PÓS), GRUPO CONTROLE E O GRUPO PLACEBO E COMPARAÇÕES ENTRE OS GRUPOS EM CADA TEMPO ESTUDADO

Variável	Tempo	CONTROLE	PRÉ	PÓS	PLACEBO	PLACEBO vs DIANEXINA	CONTROLE vs PRÉ	CONTROLE vs PÓS	CONTROLE vs PLACEBO	PRÉ vs PÓS	PRÉ vs PLACEBO	PÓS vs PLACEBO
Índice de Edema – Média	0	0,26 (0,02)	0,24 (0,03)	0,27 (0,01)	0,18 (0,03)	0,14	0,54	0,67	0,016	0,35	0,14	0,005
	2	0,28 (0,01)	0,22 (0,03)	0,28 (0,01)	0,20 (0,03)		0,078	0,96	0,020	0,066	0,63	0,015
	3	0,26 (0,02)	0,21 (0,03)	0,27 (0,01)	0,22 (0,03)		0,14	0,52	0,23	0,049	0,83	0,093
	4	0,26 (0,02)	0,20 (0,03)	0,27 (0,01)	0,20 (0,02)		0,071	0,93	0,04	0,049	0,83	0,026
Índice de Edema - Proximal	0	0,25 (0,03)	0,24 (0,03)	0,27 (0,01)	0,20 (0,03)	0,24	0,83	0,61	0,17	0,49	0,28	0,048
	2	0,26 (0,03)	0,22 (0,02)	0,30 (0,02)	0,21 (0,04)		0,30	0,24	0,23	0,03	0,88	0,019
	3	0,25 (0,03)	0,22 (0,03)	0,28 (0,02)	0,19 (0,03)		0,48	0,36	0,13	0,11	0,46	0,014
	4	0,28 (0,02)	0,21 (0,04)	0,27 (0,02)	0,24 (0,02)		0,12	0,70	0,29	0,16	0,64	0,40
Índice de Edema – Meio	0	0,27 (0,01)	0,24 (0,03)	0,26 (0,02)	0,17 (0,03)	0,17	0,39	0,71	0,012	0,63	0,16	0,046
	2	0,27 (0,02)	0,23 (0,03)	0,26 (0,03)	0,22 (0,03)		0,28	0,65	0,20	0,55	0,82	0,41
	3	0,27 (0,02)	0,21 (0,03)	0,26 (0,02)	0,23 (0,05)		0,086	0,65	0,29	0,24	0,64	0,53
	4	0,26 (0,02)	0,20 (0,03)	0,26 (0,02)	0,16 (0,03)		0,14	0,78	0,017	0,13	0,41	0,020
Índice de Edema - Distal	0	0,27 (0,02)	0,25 (0,03)	0,29 (0,02)	0,18 (0,03)	0,037	0,57	0,46	0,025	0,25	0,13	0,006
	2	0,30 (0,02)	0,21 (0,03)	0,28 (0,02)	0,17 (0,02)		0,010	0,37	< 0,001	0,062	0,34	0,005
	3	0,25 (0,02)	0,20 (0,03)	0,27 (0,03)	0,23 (0,03)		0,14	0,40	0,67	0,035	0,40	0,28
	4	0,26 (0,02)	0,20 (0,03)	0,27 (0,01)	0,19 (0,03)		0,089	0,77	0,075	0,054	0,88	0,047

APÊNDICE 7

MÉDIA DOS DIÂMETROS DAS VÊNULAS/ARTERÍOLOS NOS GRUPOS, COMPARAÇÕES ENTRE AS MÉDIAS, COMPARAÇÕES ENTRE OS GRUPOS DIANEXINA (PRÉ E PÓS), GRUPO CONTROLE E O GRUPO PLACEBO, E COMPARAÇÕES ENTRE OS GRUPOS EM CADA TEMPO ESTUDADO

Variável	Tempo	CONTROLE	PRÉ	PÓS	PLACEBO	PLACEBO vs DIANEXINA	CONTROLE vs PRÉ	CONTROLE vs PÓS	CONTROLE vs PLACEBO	PRÉ vs PÓS	PRÉ vs PLACEBO	PÓS vs PLACEBO
Diâmetro– Veia Principal	0	189,44 (13,60)	186,67 (7,06)	251,43 (31,18)	219,94 (6,88)	0,97	0,87	0,052	0,085	0,029	0,012	0,29
	2	193,44 (16,29)	191,11 (9,55)	228,71 (21,80)	205,50 (15,08)							
	3	199,67 (16,76)	195,33 (6,11)	243,57 (25,13)	216,69 (8,06)							
	4	206,56 (14,05)	197,78 (10,49)	247,71 (25,23)	221,25 (7,76)							
Diâmetro– A1	0	97,33 (6,58)	99,22 (7,60)	95,86 (5,12)	100,00 (5,55)	0,15	0,81	0,83	0,76	0,65	0,93	0,61
	2	90,89 (5,73)	74,78 (5,70)	77,00 (4,80)	88,19 (5,63)							
	3	100,44 (4,65)	74,67 (2,48)	77,29 (3,67)	87,50 (7,94)							
	4	97,33 (4,01)	75,78 (4,95)	74,86 (3,98)	92,00 (7,86)							
Diâmetro A2 e A2-1	0	73,67 (3,95)	80,72 (4,53)	101,86 (8,22)	85,22 (3,74)	0,79	0,36	0,001	0,11	0,006	0,44	0,016
	2	72,11 (6,53)	68,56 (6,06)	92,07 (5,54)	78,84 (3,35)							
	3	72,17 (5,79)	69,61 (4,33)	90,29 (3,81)	76,97 (3,58)							
	4	69,61 (7,81)	73,22 (4,03)	91,71 (3,36)	79,63 (3,34)							
Diâmetro– A3 e A3-1	0	89,22 (7,60)	80,72 (6,55)	67,36 (2,26)	69,91 (4,53)	0,82	0,38	0,007	0,032	0,049	0,17	0,65
	2	89,61 (8,16)	73,50 (5,84)	63,00 (2,44)	64,94 (5,27)							
	3	87,06 (7,04)	70,89 (4,65)	60,64 (2,60)	63,66 (4,70)							
	4	85,56 (6,83)	69,33 (6,03)	65,43 (3,30)	68,13 (5,22)							

APÊNDICE 8

MÉDIA DA VELOCIDADE DE FLUXO ENTRE OS GRUPOS APÓS 2 HORAS DE ISQUEMIA, COMPARAÇÕES ENTRE OS VALORES ENTRE TODOS OS GRUPOS, COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS DIANEXINA (PRÉ E PÓS), GRUPO CONTROLE E O GRUPO PLACEBO, E COMPARAÇÕES ENTRE OS GRUPOS EM CADA TEMPO ESTUDADO

Variável	Tempo	CONTROLE	PRÉ	PÓS	PLACEBO	PLACEBO vs DIANEXINA	CONTROLE vs PRÉ	CONTROLE vs PÓS	CONTROLE vs PLACEBO	PRÉ vs PÓS	PRÉ vs PLACEBO	PÓS vs PLACEBO
Velocidade– Veia Principal	0	10,78 (0,66)	9,89 (0,48)	9,86 (0,70)	11,28 (1,31)	0,86	0,35	0,37	0,69	0,97	0,18	0,20
	2	9,33 (0,67)	8,88 (0,55)	8,14 (0,55)	9,81 (0,68)							
	3	9,67 (1,22)	8,00 (0,41)	7,29 (0,42)	9,43 (0,54)							
	4	9,44 (0,63)	8,33 (0,41)	7,57 (0,65)	9,25 (0,56)							
							0,079	0,021	0,84	0,34	0,17	0,054
Velocidade – A1	0	14,89 (1,03)	14,44 (0,96)	11,86 (1,14)	14,51 (1,42)	0,24	0,74	0,029	0,81	0,050	0,96	0,091
	2	12,89 (0,92)	11,11 (0,68)	10,71 (1,23)	12,11 (0,90)							
	3	12,89 (1,03)	9,78 (0,57)	9,00 (0,49)	12,64 (1,36)							
	4	13,22 (0,91)	10,89 (1,05)	10,00 (0,76)	11,50 (1,10)							
							0,18	0,11	0,62	0,76	0,51	0,37
Velocidade – A2 e A2-1	0	10,33 (0,82)	10,17 (0,76)	8,71 (0,64)	10,94 (1,22)	0,75	0,89	0,10	0,63	0,12	0,53	0,039
	2	9,67 (0,74)	7,22 (0,30)	6,43 (0,47)	9,08 (0,67)							
	3	10,39 (0,94)	7,33 (0,70)	6,71 (0,29)	9,04 (0,69)							
	4	10,72 (0,88)	7,72 (0,95)	6,71 (0,45)	9,57 (0,82)							
							0,020	0,005	0,87	0,55	0,062	0,021
Velocidade – A3 e A3-1	0	10,06 (0,88)	12,61 (3,07)	8,86 (0,78)	9,14 (0,96)	0,22	0,14	0,21	0,32	0,031	0,043	0,75
	2	9,22 (0,45)	7,61 (0,49)	7,64 (0,52)	8,43 (0,28)							
	3	9,61 (0,61)	7,50 (0,43)	7,50 (0,45)	8,61 (0,48)							
	4	10,56 (0,66)	7,06 (0,27)	7,71 (0,73)	8,14 (0,37)							
							0,080	0,020	0,27	0,50	0,69	0,34
Velocidade – A2 e A2-1	0	10,33 (0,82)	10,17 (0,76)	8,71 (0,64)	10,94 (1,22)	0,75	0,89	0,10	0,63	0,12	0,53	0,039
	2	9,67 (0,74)	7,22 (0,30)	6,43 (0,47)	9,08 (0,67)							
	3	10,39 (0,94)	7,33 (0,70)	6,71 (0,29)	9,04 (0,69)							
	4	10,72 (0,88)	7,72 (0,95)	6,71 (0,45)	9,57 (0,82)							
							0,036	0,001	0,65	0,39	0,13	0,014
Velocidade – A3 e A3-1	0	10,06 (0,88)	12,61 (3,07)	8,86 (0,78)	9,14 (0,96)	0,22	0,14	0,21	0,32	0,031	0,043	0,75
	2	9,22 (0,45)	7,61 (0,49)	7,64 (0,52)	8,43 (0,28)							
	3	9,61 (0,61)	7,50 (0,43)	7,50 (0,45)	8,61 (0,48)							
	4	10,56 (0,66)	7,06 (0,27)	7,71 (0,73)	8,14 (0,37)							
							0,009	< 0,001	0,29	0,50	0,16	0,031
Velocidade – A3 e A3-1	0	10,06 (0,88)	12,61 (3,07)	8,86 (0,78)	9,14 (0,96)	0,22	0,14	0,21	0,32	0,031	0,043	0,75
	2	9,22 (0,45)	7,61 (0,49)	7,64 (0,52)	8,43 (0,28)							
	3	9,61 (0,61)	7,50 (0,43)	7,50 (0,45)	8,61 (0,48)							
	4	10,56 (0,66)	7,06 (0,27)	7,71 (0,73)	8,14 (0,37)							
							0,011	< 0,001	0,37	0,28	0,13	0,009
Velocidade – A3 e A3-1	0	10,06 (0,88)	12,61 (3,07)	8,86 (0,78)	9,14 (0,96)	0,22	0,14	0,21	0,32	0,031	0,043	0,75
	2	9,22 (0,45)	7,61 (0,49)	7,64 (0,52)	8,43 (0,28)							
	3	9,61 (0,61)	7,50 (0,43)	7,50 (0,45)	8,61 (0,48)							
	4	10,56 (0,66)	7,06 (0,27)	7,71 (0,73)	8,14 (0,37)							
							0,36	0,10	0,39	0,99	0,63	0,37
Velocidade – A3 e A3-1	0	10,06 (0,88)	12,61 (3,07)	8,86 (0,78)	9,14 (0,96)	0,22	0,14	0,21	0,32	0,031	0,043	0,75
	2	9,22 (0,45)	7,61 (0,49)	7,64 (0,52)	8,43 (0,28)							
	3	9,61 (0,61)	7,50 (0,43)	7,50 (0,45)	8,61 (0,48)							
	4	10,56 (0,66)	7,06 (0,27)	7,71 (0,73)	8,14 (0,37)							
							0,23	0,029	0,28	0,99	0,51	0,20
Velocidade – A3 e A3-1	0	10,06 (0,88)	12,61 (3,07)	8,86 (0,78)	9,14 (0,96)	0,22	0,14	0,21	0,32	0,031	0,043	0,75
	2	9,22 (0,45)	7,61 (0,49)	7,64 (0,52)	8,43 (0,28)							
	3	9,61 (0,61)	7,50 (0,43)	7,50 (0,45)	8,61 (0,48)							
	4	10,56 (0,66)	7,06 (0,27)	7,71 (0,73)	8,14 (0,37)							
							0,047	0,004	0,010	0,70	0,52	0,62

APÊNDICE 9

MÉDIA DOS NÍVEIS DE LEUCÓCITOS EM ROLAMENTO NOS GRUPOS COM 2 HORAS DE ISQUEMIA, COMPARAÇÕES ENTRE OS NÍVEIS EM GERAL, COMPARAÇÕES ENTRE OS GRUPOS DIANEXINA (PRÉ E PÓS), GRUPO CONTROLE E O GRUPO PLACEBO E COMPARAÇÕES ENTRE OS GRUPOS EM CADA TEMPO ESTUDADO

Variável	Tempo	CONTROLE	PRÉ	PÓS	PLACEBO	PLACEBO vs DIANEXINA	CONTROLE vs PRÉ	CONTROLE vs PÓS	CONTROLE evs PLACEBO	PRÉ vs PÓS	PRÉ vs PLACEBO	PÓS vs PLACEBO
Leucócitos em Rolamento – Média	0	9,85 (1,21)	10,52 (1,29)	14,14 (1,38)	7,29 (0,82)	0,016	0,75	0,050	0,22	0,017	0,020	< 0,001
	2	8,81 (1,59)	6,59 (0,46)	8,38 (0,59)	5,69 (1,16)		0,28	0,84	0,13	0,23	0,51	0,079
	3	9,00 (2,28)	6,37 (0,78)	8,62 (1,20)	6,21 (1,17)		0,20	0,86	0,18	0,14	0,91	0,11
	4	8,26 (2,07)	6,04 (0,95)	6,76 (1,15)	6,38 (0,75)		0,28	0,49	0,36	0,63	0,80	0,80
Leucócitos em Rolamento – Proximal	0	10,22 (1,63)	8,67 (1,39)	12,43 (2,26)	6,56 (1,25)	0,67	0,61	0,54	0,24	0,18	0,31	0,042
	2	7,11 (1,37)	5,78 (0,85)	10,29 (1,91)	6,81 (1,79)		0,66	0,38	0,92	0,11	0,62	0,22
	3	10,00 (3,14)	5,67 (0,85)	11,86 (2,15)	7,19 (1,97)		0,16	0,61	0,37	0,028	0,47	0,10
	4	10,44 (3,72)	6,56 (2,01)	8,86 (2,82)	6,50 (0,85)		0,20	0,66	0,21	0,41	0,98	0,41
Leucócitos em Rolamento – Médio	0	8,22 (1,53)	12,44 (2,72)	15,57 (2,49)	7,81 (1,20)	0,043	0,069	0,001	0,83	0,19	0,035	< 0,001
	2	9,44 (1,38)	7,33 (0,71)	6,71 (0,75)	5,06 (1,10)		0,36	0,21	0,026	0,80	0,30	0,42
	3	9,33 (1,69)	6,33 (1,83)	8,57 (1,77)	7,25 (1,45)		0,19	0,73	0,29	0,35	0,67	0,52
	4	6,56 (1,25)	6,78 (0,94)	5,86 (0,63)	6,38 (1,28)		0,92	0,75	0,93	0,70	0,85	0,80
Leucócitos em Rolamento – Distal	0	11,11 (1,78)	10,44 (1,24)	14,43 (1,21)	7,50 (1,69)	0,072	0,81	0,24	0,23	0,006	0,099	< 0,001
	2	9,89 (3,06)	6,67 (0,71)	8,14 (1,28)	5,19 (1,46)		0,25	0,53	0,12	0,30	0,40	0,10
	3	7,67 (2,53)	7,11 (0,89)	5,43 (0,57)	4,19 (0,58)		0,84	0,42	0,25	0,23	0,10	0,49
	4	7,78 (2,90)	4,78 (0,88)	5,57 (0,84)	6,25 (1,81)		0,28	0,43	0,61	0,57	0,41	0,71

APÊNDICE 10

MÉDIA DOS NÍVEIS DE LEUCÓCITOS ADERIDOS NOS GRUPOS COM 2 HORAS DE ISQUEMIA, COMPARAÇÕES ENTRE OS NÍVEIS EM GERAL, COMPARAÇÕES ENTRE OS GRUPOS DIANEXINA (PRÉ E PÓS), GRUPO CONTROLE E O GRUPO PLACEBO E COMPARAÇÕES ENTRE OS GRUPOS EM CADA TEMPO ESTUDADO

Variável	Tempo	CONTROLE	PRÉ	PÓS	PLACEBO	PLACEBO vs DIANEXINA	CONTROLE vs PRÉ	CONTROLE vs PÓS	CONTROLE vs PLACEBO	PRÉ vs PÓS	PRÉ vs PLACEBO	PÓS vs PLACEBO
Leucócitos Aderidos – Média	0	3,07 (0,44)	3,81 (0,36)	1,19 (0,32)	3,40 (0,60)	0,62	0,14	< 0,001	0,65	< 0,001	0,50	0,001
	2	3,37 (0,44)	3,22 (0,15)	2,14 (0,36)	4,15 (0,41)							
	3	3,56 (0,44)	3,04 (0,17)	2,19 (0,31)	4,44 (0,67)							
	4	4,30 (0,39)	4,04 (0,29)	2,38 (0,37)	4,79 (0,52)							
	4						0,60	< 0,001	0,48	< 0,001	0,22	< 0,001
Leucócitos Aderidos – Proximal	0	3,56 (0,69)	4,00 (0,65)	0,71 (0,29)	3,44 (0,61)	0,54	0,65	0,003	0,92	< 0,001	0,58	0,005
	2	3,78 (0,62)	2,44 (0,38)	1,57 (0,57)	4,56 (0,62)							
	3	4,89 (0,82)	3,56 (0,34)	2,00 (0,38)	4,81 (1,38)							
	4	5,44 (1,04)	3,67 (0,71)	2,29 (0,47)	4,25 (0,49)							
	4						0,076	0,001	0,31	0,052	0,56	0,042
Leucócitos Aderidos – Meio	0	3,00 (0,50)	4,00 (0,69)	1,86 (0,51)	3,44 (0,82)	0,13	0,19	0,18	0,59	0,006	0,44	0,053
	2	3,67 (0,50)	3,44 (0,24)	2,43 (0,30)	4,06 (0,52)							
	3	3,11 (0,72)	2,56 (0,29)	2,29 (0,29)	4,31 (0,37)							
	4	4,22 (0,66)	4,67 (0,53)	3,29 (0,92)	4,44 (0,26)							
	4						0,56	0,27	0,79	0,071	0,75	0,16
Leucócitos Aderidos – Distal	0	2,67 (0,58)	3,44 (0,44)	1,00 (0,44)	3,31 (0,63)	0,25	0,20	0,017	0,54	< 0,001	0,89	0,028
	2	2,67 (0,62)	3,78 (0,22)	2,43 (0,53)	3,81 (0,44)							
	3	2,67 (0,44)	3,00 (0,29)	2,29 (0,52)	4,19 (0,58)							
	4	3,22 (0,36)	3,78 (0,22)	1,57 (0,37)	5,69 (1,47)							
	4						0,35	0,018	0,022	< 0,001	0,054	< 0,001

APÊNDICE 11

MÉDIA DOS NÍVEIS DE LEUCÓCITOS TRANSMIGRADOS NOS GRUPOS COM 2 HORAS DE ISQUEMIA, COMPARAÇÕES ENTRE OS NÍVEIS EM GERAL, COMPARAÇÕES ENTRE OS GRUPOS DIANEXINA (PRÉ E PÓS), GRUPO CONTROLE E O GRUPO PLACEBO E COMPARAÇÕES ENTRE OS GRUPOS EM CADA TEMPO ESTUDADO

Variável	Tempo	CONTROLE	PRÉ	PÓS	PLACEBO	PLACEBO vs DIANEXINA	CONTROLE vs PRÉ	CONTROLE vs PÓS	CONTROLE vs PLACEBO	PRÉ vs PÓS	PRÉ vs PLACEBO	PÓS vs PLACEBO
Leucócitos Transmigrados – Média	0	1,33 (0,36)	0,59 (0,17)	0,05 (0,05)	1,05 (0,30)	0,32	0,14	0,006	0,65	0,074	0,37	0,036
	2	2,04 (0,42)	1,48 (0,22)	0,67 (0,16)	1,79 (0,22)							
	3	2,22 (0,60)	1,81 (0,26)	0,81 (0,23)	2,79 (0,66)							
	4	2,22 (0,34)	2,48 (0,34)	0,76 (0,12)	2,71 (0,49)							
Leucócitos Transmigrados – Proximal	0	1,33 (0,55)	0,78 (0,36)	0,14 (0,14)	1,25 (0,41)	0,73	0,52	0,14	0,93	0,21	0,48	0,058
	2	2,44 (0,44)	1,78 (0,28)	0,71 (0,18)	2,13 (0,35)							
	3	2,78 (1,24)	2,44 (0,41)	1,14 (0,40)	3,13 (0,79)							
	4	2,56 (0,53)	2,67 (0,58)	0,57 (0,20)	2,13 (0,40)							
Leucócitos Transmigrados – Meio	0	1,89 (0,51)	0,44 (0,18)	0,00 (0,00)	1,00 (0,44)	0,12	0,018	0,002	0,22	0,29	0,22	0,035
	2	1,56 (0,38)	1,22 (0,22)	1,00 (0,38)	2,25 (0,37)							
	3	2,44 (0,71)	1,56 (0,34)	0,71 (0,36)	2,50 (0,53)							
	4	2,11 (0,42)	2,33 (0,41)	0,86 (0,26)	2,00 (0,33)							
Leucócitos Transmigrados – Distal	0	0,78 (0,32)	0,56 (0,24)	0,00 (0,00)	0,94 (0,20)	0,13	0,73	0,24	0,88	0,21	0,70	0,35
	2	2,11 (0,90)	1,44 (0,29)	0,29 (0,18)	1,00 (0,27)							
	3	1,44 (0,53)	1,44 (0,29)	0,57 (0,43)	2,75 (1,22)							
	4	2,00 (0,29)	2,44 (0,34)	0,86 (0,46)	4,00 (1,36)							

APÊNDICE 12

MÉDIA DOS NÍVEIS DE LEUCÓCITOS EM ROLAMENTO NOS GRUPOS COM 2 HORAS DE ISQUEMIA, COMPARAÇÕES ENTRE OS NÍVEIS EM GERAL, COMPARAÇÕES ENTRE OS GRUPOS DIANEXINA (PRÉ E PÓS) , GRUPO CONTROLE E O GRUPO PLACEBO E COMPARAÇÕES ENTRE OS GRUPOS EM CADA TEMPO ESTUDADO

Variável	Tempo	CONTROLE	PRÉ	PÓS	PLACEBO	PLACEBO vs DIANEXINA	CONTROLE vs PRÉ	CONTROLE vs PÓS	CONTROLE vs PLACEBO	PRÉ vs PÓS	PRÉ vs PLACEBO	PÓS vs PLACEBO						
Leucócitos em Rolamento – Média	0	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	0,29	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99						
	2	1,13 (0,19)	0,76 (0,09)	0,71 (0,09)	1,14 (0,29)								0,071	0,036	0,97	0,68	0,085	0,047
	3	1,05 (0,24)	0,77 (0,14)	0,72 (0,15)	1,03 (0,17)								0,17	0,11	0,94	0,74	0,23	0,16
	4	0,89 (0,19)	0,74 (0,13)	0,55 (0,12)	1,14 (0,19)								0,46	0,10	0,35	0,20	0,073	0,009
	Leucócitos em Rolamento – Proximal	0	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)		1,00 (0,00)	0,58	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99				
2		0,86 (0,24)	0,78 (0,13)	1,04 (0,34)	1,84 (0,91)	0,80	0,63								0,10	0,46	0,073	0,20
3		0,99 (0,21)	0,91 (0,31)	1,23 (0,39)	1,27 (0,24)	0,82	0,52								0,64	0,37	0,54	0,95
4		1,05 (0,36)	0,89 (0,24)	0,83 (0,31)	1,53 (0,55)	0,61	0,55								0,42	0,87	0,27	0,26
Leucócitos em Rolamento – Meio		0	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	0,19		0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99				
	2	1,53 (0,32)	0,84 (0,18)	0,50 (0,08)	0,78 (0,19)	0,028		< 0,001							0,017	0,043	0,78	0,092
	3	1,45 (0,39)	0,68 (0,17)	0,55 (0,07)	1,07 (0,21)	0,014		0,001							0,22	0,45	0,076	0,003
	4	0,97 (0,22)	0,85 (0,19)	0,43 (0,07)	0,89 (0,15)	0,70		0,050							0,80	0,014	0,86	0,007
	Leucócitos em Rolamento – Distal	0	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)		0,14	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99				
2		1,02 (0,28)	0,67 (0,07)	0,58 (0,08)	0,81 (0,22)	0,10	0,038								0,45	0,29	0,42	0,19
3		0,72 (0,20)	0,72 (0,08)	0,39 (0,04)	0,76 (0,16)	0,99	0,12								0,87	< 0,001	0,83	0,044
4		0,64 (0,21)	0,47 (0,07)	0,40 (0,06)	0,98 (0,21)	0,42	0,25								0,20	0,40	0,007	0,002

APÊNDICE 13

MÉDIA DOS NÍVEIS DE LEUCÓCITOS ADERIDOS NOS GRUPOS COM 2 HORAS DE ISQUEMIA, COMPARAÇÕES ENTRE OS NÍVEIS EM GERAL, COMPARAÇÕES ENTRE OS GRUPOS DIANEXINA (PRÉ E PÓS), GRUPO CONTROLE E O GRUPO PLACEBO E COMPARAÇÕES ENTRE OS GRUPOS EM CADA TEMPO ESTUDADO

Variável	Tempo	CONTROLE	PRÉ	PÓS	PLACEBO	PLACEBO vs DIANEXINA	CONTROLE vs PRÉ	CONTROLE vs PÓS	CONTROLE vs PLACEBO	PRÉ vs PÓS	PRÉ vs PLACEBO	PÓS vs PLACEBO
Leucócitos Aderidos – Média	0	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	0,82	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
	2	1,31 (0,19)	1,03 (0,11)	2,21 (0,47)	1,49 (0,21)							
	3	1,37 (0,13)	0,96 (0,09)	2,35 (0,42)	1,83 (0,55)							
	4	1,90 (0,39)	1,31 (0,17)	2,48 (0,54)	2,10 (0,64)							
							0,28	0,058	0,71	0,007	0,31	0,24
Leucócitos Aderidos – Proximal	0	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	0,48	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
	2	1,19 (0,20)	0,82 (0,20)	1,71 (0,57)	1,60 (0,34)							
	3	1,86 (0,49)	1,16 (0,26)	2,79 (0,71)	1,86 (0,73)							
	4	2,44 (1,09)	1,21 (0,30)	3,14 (0,94)	1,44 (0,22)							
							0,60	0,57	0,59	0,20	0,089	0,89
Leucócitos Aderidos – Meio	0	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	0,37	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
	2	1,47 (0,35)	1,05 (0,17)	1,74 (0,42)	1,51 (0,27)							
	3	1,13 (0,23)	0,75 (0,10)	1,77 (0,50)	1,68 (0,30)							
	4	1,65 (0,26)	1,47 (0,30)	2,43 (1,04)	1,79 (0,34)							
							0,16	0,70	0,91	0,31	0,14	0,75
Leucócitos Aderidos – Distal	0	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	0,14	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
	2	1,26 (0,35)	1,21 (0,13)	3,19 (1,11)	1,36 (0,19)							
	3	1,10 (0,28)	0,96 (0,14)	2,48 (0,59)	1,97 (0,87)							
	4	1,63 (0,35)	1,26 (0,19)	1,88 (0,60)	3,06 (1,73)							
							0,21	0,061	0,44	0,030	0,36	0,69
							0,24	0,73	0,21	0,37	0,11	0,36

APÊNDICE 14

MÉDIA DOS NÍVEIS DE LEUCÓCITOS TRANSMIGRADOS NOS GRUPOS COM 2 HORAS DE ISQUEMIA, COMPARAÇÕES ENTRE OS NÍVEIS EM GERAL, COMPARAÇÕES ENTRE OS GRUPOS DIANEXINA (PRÉ E PÓS) , GRUPO CONTROLE E O GRUPO PLACEBO E COMPARAÇÕES ENTRE OS GRUPOS EM CADA TEMPO ESTUDADO

Variável	Tempo	CONTROLE	PRÉ	PÓS	PLACEBO	PLACEBO vs DIANEXINA	CONTROLE vs PRÉ	CONTROLE vs PÓS	CONTROLE vs PLACEBO	PRÉ vs PÓS	PRÉ vs PLACEBO	PÓS vs PLACEBO
Leucócitos Transmigrados	0	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	0,54	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
– Média	2	1,93 (0,31)	2,00 (0,24)	1,33 (0,33)	1,84 (0,35)							
	3	1,74 (0,32)	2,36 (0,24)	1,62 (0,46)	2,77 (0,65)							
	4	2,24 (0,37)	3,52 (0,49)	1,48 (0,25)	2,80 (0,57)							
							0,003	0,072	0,30	0,001	0,18	0,018
Leucócitos Transmigrados	0	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	0,84	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
– Proximal	2	2,90 (0,80)	2,17 (0,37)	1,43 (0,37)	2,46 (0,88)							
	3	2,43 (1,03)	2,91 (0,50)	2,29 (0,81)	3,00 (0,85)							
	4	2,54 (0,49)	3,35 (0,62)	1,00 (0,38)	2,04 (0,59)							
							0,31	0,067	0,60	0,001	0,11	0,21
Leucócitos Transmigrados	0	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	0,33	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
– Meio	2	0,95 (0,26)	2,00 (0,44)	2,00 (0,76)	2,14 (0,34)							
	3	1,39 (0,31)	2,22 (0,55)	1,43 (0,72)	2,57 (0,43)							
	4	1,58 (0,39)	3,56 (0,75)	1,71 (0,52)	2,33 (0,49)							
							0,001	0,83	0,099	0,018	0,053	0,36
Leucócitos Transmigrados	0	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	1,00 (0,00)	0,33	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
– Distal	2	1,94 (0,50)	1,83 (0,35)	0,57 (0,37)	1,00 (0,27)							
	3	1,39 (0,45)	1,94 (0,44)	1,14 (0,86)	2,88 (1,20)							
	4	2,61 (0,65)	3,67 (0,75)	1,71 (0,92)	4,13 (1,33)							
							0,12	0,27	0,15	0,018	0,66	0,035

APÊNDICE 15

MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA RAZÃO DO DIÂMETRO INTERNO E EXTERNO, O ÍNDICE DE PERMEABILIDADE, SÃO APRESENTADOS POR GRUPO DE TRATAMENTO E TEMPO DE AVALIAÇÃO PARA O GRUPOS SUBMETIDOS A 2 HORAS DE ISQUEMIA

Tempo	Grupo	N	Média (SEM)		
		Animais	Externo	Interno	Razão
0	CONTROLE	8	61,26 (2,59)	168,76 (1,12)	0,36 (0,014)
	PLACEBO	6	58,55 (10,11)	153,46 (14,03)	0,37 (0,043)
	PRÉ	6	60,34 (4,50)	162,86 (2,25)	0,37 (0,023)
	PÓS	7	56,67 (3,26)	163,79 (2,24)	0,35 (0,017)
15	CONTROLE	8	66,30 (2,61)	166,56 (0,84)	0,40 (0,015)
	PLACEBO	6	64,26 (8,87)	154,34 (10,07)	0,41 (0,041)
	PRÉ	6	65,38 (4,16)	162,93 (2,14)	0,40 (0,022)
	PÓS	7	61,19 (3,80)	160,74 (2,30)	0,38 (0,019)
30	CONTROLE	8	70,60 (2,38)	167,14 (1,54)	0,42 (0,013)
	PLACEBO	6	70,82 (8,45)	156,49 (9,44)	0,45 (0,038)
	PRÉ	6	69,67 (4,84)	163,82 (1,14)	0,42 (0,028)
	PÓS	7	66,76 (4,64)	163,67 (1,97)	0,41 (0,025)
45	CONTROLE	8	77,20 (3,69)	167,33 (1,49)	0,46 (0,019)
	PLACEBO	6	75,94 (8,87)	156,42 (9,28)	0,48 (0,042)
	PRÉ	6	76,00 (3,52)	164,53 (1,56)	0,46 (0,020)
	PÓS	7	69,65 (4,70)	163,99 (1,61)	0,42 (0,027)
60	CONTROLE	8	82,56 (3,19)	167,82 (0,97)	0,49 (0,017)
	PLACEBO	6	85,03 (9,23)	156,52 (9,11)	0,54 (0,046)
	PRÉ	6	82,36 (4,75)	165,28 (1,12)	0,50 (0,026)
	PÓS	7	73,73 (5,98)	164,88 (1,34)	0,45 (0,035)

APÊNDICE 16

COMPARAÇÃO DA RAZÃO ENTRE AS MÉDIAS (ÍNDICE DE PERMEABILIDADE) ENTRE OS GRUPOS EM GERAL E POR TEMPO SÃO APRESENTADOS

	Média das Razões (SEM)				Valores - p					
Tempo	CONTROLE	PLACEBO	PRÉ	PÓS	CON- TROLE vs PLACE- BO	CONTRO- LE vs PRÉ	CONTRO- LE vs PÓS	PLACEBO vs PRÉ	PLACEBO vs PÓS	PRÉ vs PÓS
Todos	0,43 (0,024)	0,45 (0,028)	0,43 (0,028)	0,40 (0,026)	0,46	0,87	0,39	0,59	0,14	0,34
0	0,36 (0,014)	0,37 (0,043)	0,37 (0,023)	0,35 (0,017)	0,90	0,85	0,60	0,95	0,54	0,50
15	0,40 (0,015)	0,41 (0,041)	0,40 (0,022)	0,38 (0,019)	0,68	0,94	0,58	0,76	0,36	0,55
30	0,42 (0,013)	0,45 (0,038)	0,42 (0,028)	0,41 (0,025)	0,46	0,95	0,65	0,53	0,26	0,63
45	0,46 (0,019)	0,48 (0,042)	0,46 (0,020)	0,42 (0,027)	0,54	0,97	0,33	0,59	0,14	0,35
60	0,49 (0,017)	0,54 (0,046)	0,50 (0,026)	0,45 (0,035)	0,25	0,89	0,29	0,34	0,043	0,27



Maria Siemionow, MD, PhD, DSc
Professor of Surgery
Director, Plastic Surgery Research
Head, Microsurgery Training

July 14, 2010

RE: ANNE KAROLINE GROTH


To Whom It May Concern:

This letter grants permission to Anne Karoline Groth to include, in her PhD thesis, part of the material of her research prepared in the Microsurgery Laboratory at Cleveland Clinic.

This includes the data from the microcirculation studies assessing the effects of Diannexin on ischemia reperfusion injury using the cremaster muscle microcirculation model. Part of this research was published in *Annals of Plastic Surgery*, Volume 63, Number 5, pages 564-571, November 2009.

This dissertation will be made available to the public through the Federal University of Parana Library, with acknowledgment of Cleveland Clinic's support of this study.

With Very Best Regards,



Maria Siemionow, MD, PhD, DSc

The Cleveland Clinic Foundation
Department of Plastic Surgery

9500 Euclid Avenue / A-60
Cleveland, Ohio 44195

Tel 216 445-2405
Fax 216 444-9419
siemiom@ccf.org